Struktur-Wirkungsanalyse von Nifedipine

Inotrope Wirkungen, qualitative und quantitative Beziehung zwischen Struktur und Aktivität

Ralph Rodenkirchen

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544323_0021

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)
der Universität Düsseldorf

STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE VON NIFEDIPINE. INOTROPE WIRKUNGEN, QUALITATIVE UND QUANTITATIVE BEZIEHUNG ZWISCHEN STRUKTUR UND AKTIVITÄT

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ralph Rodenkirchen

aus Bergisch-Gladbach

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Kaufmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Birkofer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.1.1978

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AFB	Amplituden-Frequenzbeziehung
AP	Aktionspotential
DC	Dünnschichtchromatographie
DHP	Dihydropyridin
ED	Effektive Dosis
EMK	Elektromechanische Koppelung
LZ	Laterale Zisterne
QSWA	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SS	Subsarkolemmal
TTS	Transversales tubuläres System
VC	Voltage clamp
VS	Versuchssubstanz

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Zur antianginösen Wirkung Ca-antagonistischer Pharmaka	1
1.2	Zur Chemie und Pharmakologie der 1,4-Dihydropyridinverbindungen unter besonderer Berücksichtigung von Nifedipine	9
1.3	Die quantitative Struktur-Wirkungsanalyse (QSWA)	13
1.4	Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	15
2.	METHODIK UND UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	16
2.1	Die Muskelpräparate	16
2.2	Die Lösungen	17
2.3	Der Versuchsaufbau	17
2.3.1	Das Versuchsbad	17
2.3.2	Der Muskelhebel und die Wegmessung isotoner Kontraktionen	19
2.4	Die Hansch-Analyse	20
2.4.1	Die mathematischen und statistischen Voraussetzungen	20
2.4.2	Die physikochemischen Parameter der quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse	23
2.5	Die dünnschichtchromatographische Bestimmung der Lipophiliekonstanten R_M	26
2.6	Die Versuchssubstanzen	28
3.	ERGEBNISSE	32
3.1	Die qualitativen und quantitativen Bestimmungen inotroper Wirkungen von Nifedipine	32
3.1.1	Die Kinetik der Nifedipinewirkung	32
3.1.2	Das Treppenverhalten und die Amplituden-Frequenzbeziehung unter der Einwirkung von Nifedipine	34
3.1.3	Der Einfluß von Nifedipine auf die Amplituden-Pausenbeziehung	42
3.1.4	Die Dosis-Wirkungsbeziehung für Nifedipine und den zugehörigen Hauptmetaboliten	45

Seite

3.2 Die Wirkmusteranalyse von Nifedipine-ähnlichen Verbindungen 51

3.2.1 Die Versuche zur Auswahl und Eingrenzung der Testsubstanzen 51

3.2.2 Die qualitative Struktur-Wirkungsanalyse von Derivaten mit Substitutionsort am Aromaten 54

3.2.2.1 Substituentenvariationen in ortho-Position 55
3.2.2.2 Substituentenvariationen in meta-Position 58
3.2.2.3 Substituentenvariationen in para-Position und mehrfache Ringsubstitution 61

3.2.3 Variationen der Estergruppierung 66

3.3 Die Lipophiliekonstanten der Versuchssubstanzen 69

3.4 Die Ergebnisse der Hansch-Analyse 74

3.4.1 Einzelkorrelationen mit DHP-Derivaten, deren Estergruppierungen variieren 74

3.4.2 Regressionsanalysen mit DHP-Derivaten, deren Substituenten am Aromaten variieren 77

3.4.2.1 Korrelationen mit ortho-substituierten Derivaten 79
3.4.2.2 Korrelationen mit meta-substituierten Derivaten 81
3.4.2.3 Korrelationen mit ortho- und meta-substituierten Derivaten 82
3.4.2.4 Korrelationen mit ortho-, meta- und para-substituierten Derivaten 84

3.4.3 Die Wirkungsvorhersage, ein Anwendungsbeispiel der Hansch-Analyse 86

4. DISKUSSION 88

4.1 Die Beeinflussung kontraktiler Phänomene durch Nifedipine 88

4.2 Die Wirkung abgewandelter Molekülstrukturen auf das isolierte Muskelpräparat 93

4.3 Die Anwendung der Hansch-Analyse 100

5. ZUSAMMENFASSUNG 107

6. LITERATURVERZEICHNIS 109

7. ANHANG 120

1. EINLEITUNG

1.1 ZUR ANTIANGINÖSEN WIRKUNG Ca-ANTAGONISTISCHER PHARMAKA

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt eine Gruppe von Erkrankungen des Koronargefäßsystems dar, bei der ein Mißverhältnis zwischen myokardialem O_2-Bedarf und O_2-Angebot besteht. Die medikamentöse Therapie der KHK verfolgt dementsprechend zwei prinzipielle Ziele: die Koronardurchblutung zu vermehren bzw. den myokardialen O_2-Verbrauch zu senken. Eine Erhöhung der Koronardurchblutung kann beispielsweise durch eine Dilatation der Koronargefäße erfolgen (RABERGER und KRAUPP, 1971); dieser Wirkmechanismus stellt jedoch ein bis heute umstrittenes Therapieprinzip dar. Nach allgemeiner Ansicht werden durch diese Maßnahme vorwiegend die gesunden (d.h. dilatierbaren) Gefäßbereiche mehr durchblutet und damit dem erkrankten Gefäßbereich zusätzlich Blut entzogen (coronary steal).

Im Gegensatz zu dieser Maßnahme kann der myokardiale O_2-Verbrauch durch folgende Mechanismen reduziert werden:

1) Senkung des peripheren Widerstandes, gegen den das Herz arbeiten muß (= Senkung der Nachbelastung),
2) Senkung der Herzfrequenz (= Senkung der Herzleistung),
3) Verringerung des diastolischen Blutzuflusses durch venöses pooling (= Senkung der Vorbelastung),
4) Verminderung der kontraktilen Aktivierung der einzelnen Herzmuskelzelle.

Die Substanz Nifedipine (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester) wirkt nach pharmakologischen und klinischen Untersuchungen (VATER et al., 1972; SCHNEIDER und JESSE, 1972) über alle diese aufgezählten Mechanismen. Eine Frequenzsenkung tritt in vivo allerdings nicht ein (RAFF, KOSCHE und LOCHNER, 1972). Dieses vielseitige Wirkungsspektrum entfaltet Nifedipine durch einen

Eingriff in die zentralen Prozesse der elektromechanischen Koppelung (EMK)+) an Herzmuskelzellen und an glatten Muskelzellen (FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972), indem diese pharmakologisch neue Substanz den langsamen Ca^{2+}-Einwärtsstrom durch die erregte Zellmembran hemmt (EHARA und KAUFMANN, 1977). Ein solcher Wirkmechanismus wurde bereits von der Arbeitsgruppe um FLECKENSTEIN für andere anorganische und organische Stoffe nachgewiesen und als Ca-Antagonismus bezeichnet (KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1973; FLECKENSTEIN, GRÜN, TRITTHART, BYON und HARDING, 1971). KOHLHARDT (KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972) konnte anhand von voltage clamp Experimenten zeigen, daß tatsächlich im Falle der organischen Substanzen D 600 und Verapamil der erregungsbedingte langsame Ca^{2+}-Einwärtsstrom in die Myokardzelle gehemmt wird. Aus diesen Resultaten wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß durch die verminderte transmembranäre Ca^{2+}-Versorgung der intrazelluläre Kalziumgehalt sinkt, so daß im Moment der Erregung weniger Aktivatorkalzium für die Kontraktionsauslösung und den Kontraktionsprozeß zur Verfügung steht. Durch das verringerte Ca^{2+}-Angebot an das regulative Muskelprotein Troponin C wird die Bildung des Aktin-Myosin-Komplexes gehemmt (zusammenfaßende Darstellung siehe EBASHI, MASAKI und TSUKUI, 1974; EBASHI und ENDO, 1968). Eine Abnahme der kontraktilen Aktivität ist die Folge; gleichzeitig ist die Utilisation des energieliefernden ATP-Komplexes vermindert (FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967), da die ATP-Spaltung durch die ATPase-Aktivität des Aktin-Myosinkomplexes gesteuert wird. Entsprechend diesen zellulären Wirkmechanismen relaxieren Ca-Antagonisten auch die glattmuskulären peripheren Widerstandsgefäße (GRÜN und FLECKENSTEIN, 1971), wirken am Herzen negativ inotrop (FLEKKENSTEIN, TRITTHART, FLECKENSTEIN, HERBST und GRÜN, 1969) und

---

+) Unter dem Begriff EMK wird die Kette der Ereignisse zusammengefaßt, die zwischen der elektrischen Membranerregung und der anschließenden Kontraktion abläuft. Im Rahmen dieser Prozesse spielen Kalziumionen eine wesentliche Rolle, indem sie u.a. (im Zusammenspiel mit den regulativen Proteinen des Troponin-Tropomyosinsystems) die Interaktion der kontraktilen Proteine Aktin und Myosin ermöglichen.

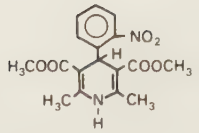
reduzieren gleichzeitig den myokardialen Energie- bzw. O_2-Bedarf.

Für die Substanzen Verapamil, D 600 und Prenylamin (siehe Abb. 1) konnte aufgrund gewisser molekularer Ähnlichkeiten ein gemeinsamer Wirkmechanismus (FLECKENSTEIN, GRÜN, TRITTHART, BYON und HARDING, 1971) angenommen werden. Dieses Postulat erscheint jedoch für Nifedipine (FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972) und andere Ca-Antagonisten (siehe Abb. 1) allein aus strukturellen und physikochemischen Überlegungen heraus nicht vertretbar. Die Ausgangshypothese der vorliegenden Arbeit war daher, daß für Nifedipine (und seine Derivate) unterschiedliche zelluläre Wirkorte als z.B. für Verapamil im Rahmen von Kalziumbewegungen der EMK angenommen werden müssen.

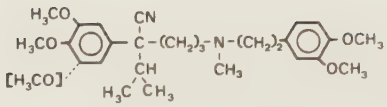
So ist zunächst einmal zu vermuten, daß Ca-antagonistische Hemmstoffe nicht nach dem von FLECKENSTEIN definierten einfachen Mechanismus an der Plasmamembran wirken. Es besteht nämlich heute Klarheit darüber, daß die Ionenströme im langsamen "Ca-Kanal" - ähnlich wie im schnellen "Na-Kanal" - unter der Kontrolle von drei unabhängigen Elementarprozessen stehen:

1) Einem vermutlich an der Membranaußenseite befindlichen Aktivierungssystem,
2) einem an der Membraninnenseite befindlichen Inaktivierungssystem und
3) einem für die Restitution des Kanals verantwortlichen Kontrollsystem (KOHLHARDT, KRAUSE, KÜBLER und HERDEY, 1975).

Dementsprechend können Pharmaka bereits den erregungsbedingten transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstrom in verschiedener Weise beeinflussen, indem sie mit dem einen oder anderen, eventuell sogar mit mehreren der drei erwähnten Kontrollsysteme interferieren.

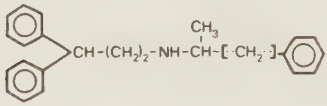


NIFEDIPINE



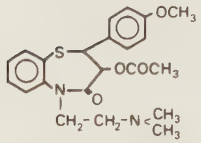
VERAPAMIL

D 600 : + [- OCH_3]

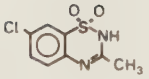


FENDILINE

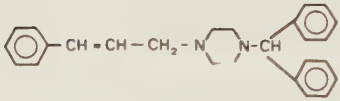
PRENYLAMIN : + [- CH_2]



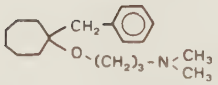
DILTIAZEM



DIAZOXIDE



CINNARIZIN



BENCYCLAN

Abb. 1: Pharmaka, die als Ca-Antagonisten bezeichnet werden (FLECKENSTEIN und FLECKENSTEIN-GRÜN, 1977; GODFRAIND und KABA, 1972; WOHL, HAUSLER und ROTH, 1967). Lediglich für Nifedipine, Verapamil, D 600 und Prenylamin ist bisher durch voltage clamp Experimente nachgewiesen, daß diese Stoffe den erregungsbedingten langsamen Ca^{2+}-Einwärtsstrom in die Zelle hemmen (EHARA und KAUFMANN, 1977; KOHLHARDT, BAUER, KRAUSE und FLECKENSTEIN, 1972; HAAS, KERN, BENNINGER und EINWÄCHTER, 1975). Im Falle von Fendiline, Diltiazem, Diazoxide, Cinnarizin und Bencyclan liegt ein solcher experimenteller Beweis noch nicht vor. Die exakten Nomenklaturen dieser Pharmaka finden sich im Anhang.

Darüberhinaus kann man vermuten, daß Ca-antagonistische Wirkstoffe auch nicht plasmamembrangebundene Angriffspunkte aufweisen. So haben neuere Untersuchungen von BAYER (BAYER, RODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976) deutlich gemacht, daß die einzelnen Ca-Antagonisten sehr unterschiedliche inotrope Wirkmuster besitzen, deren Deutung zum Teil nur dann möglich ist, wenn man annimmt, daß die fraglichen Substanzen auch in die Kinetik subzellulärer Ca^{2+}-Bewegungen eingreifen.

Grundsätzlich muß bei einer Deutung molekularer Wirkmechanismen auf allgemein anerkannte Konzepte (zur EMK der Herzmuskelzelle) zurückgegriffen werden, die die Koppelungsprozesse durch eine große Zahl transmembranärer und subzellulärer Ca^{2+}-Bewegungen beschreiben (CHAPMAN und NIEDERGERKE, 1970; MANRING und HOLLANDER, 1971; BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; WUSSLING und SZYMANSKY, 1973; KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974). Über einzelne potential- und zeitabhängige Ca^{2+}-Bewegungen bestehen zwar bei den verschiedenen Autoren unterschiedliche Auffassungen, jedoch basieren alle Modellvorstellungen auf einem etwa gleichen Grundkonzept.

Die Abb. 2 zeigt als Beispiel die wesentlichen physiologischen Postulate des Modells der EMK des Herzens nach KAUFMANN (KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974) sowie ein Reaktionsschema der Ca^{2+}-Bewegungen nach BAYER (BAYER, 1977). Nach diesen Modellvorstellungen finden Ca^{2+}-Bewegungen zwischen zwei Subsystemen statt:
1) Einem transmembranären Austausch- und Versorgungssystem,
2) einem intrazellulären Abgabe- und Wiederaufnahmesystem.

Beim Warmblütermyokard ist die Kalziummenge, die während der Membranerregung in die Zelle einströmt zu gering (WINEGRAD und SHANES, 1962), um eine vollständige Kontraktionsaktivierung zu gestatten. Zur vollen Aktivierung der kontraktilen Proteine bedarf die Myokardzelle daher intrazellulärer Kal-

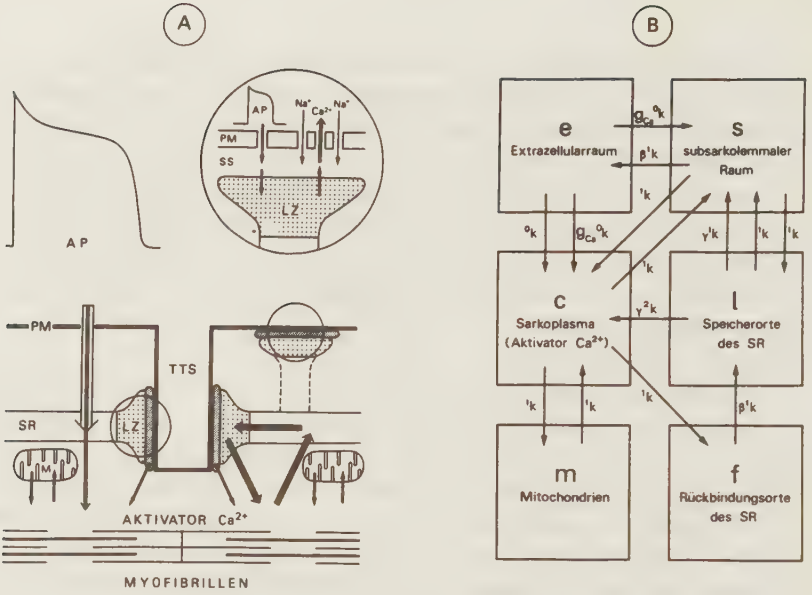


Abb. 2: Bildteil A: Schematische Darstellung der transmembranären und subzellulären Ca^{2+}-Bewegungen der EMK am Herzen. Da der potentialabhängige Ca^{2+}-Einwärtsstrom während eines Aktionspotentials (AP) für eine vollständige Kontraktionsaktivierung nicht ausreicht, wird eine zusätzliche intrazelluläre Ca^{2+}-Freisetzung in diesem Modell postuliert. Diese Freisetzung, bewirkt durch Membrandepolarisation über das transversale tubuläre System (TTS), soll im wesentlichen aus den lateralen Zisternen (LZ) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) stattfinden. Zur Muskelerschlaffung wird das freigesetzte Kalzium von den kontraktilen Proteinen in das SR zurückgebunden. Diese Rückbindungsorte im SR sind vermutlich nicht identisch mit den Speicherorten der LZ. Höchstwahrscheinlich erreicht Kalzium erst in einem 2. membranpotentialabhängigen Schritt die LZ. Im Kreisausschnitt wird der Ca^{2+}-Efflux als Na^{+}-Ca^{2+}-Austauschdiffusion dargestellt, wobei ein subsarkolemmaler Raum (SS) mit hoher Ca^{2+}-Konzentration als Austauschkompartiment zwischen Extrazellulärraum und den LZ fungiert. Die Ca^{2+}-Bewegungen der EMK lassen sich demnach in zwei Teilbewegungssysteme gliedern: Ein intrazelluläres Abgabe- und Aufnahme- sowie ein transmembranäres Austausch- und Auffüllsystem.

Bildteil B: Das Modell der EMK wird als Reaktionsschema von Ca^{2+}-Bewegungen zwischen sechs Kompartimenten dargestellt. Die verwendeten Bezeichnungen bedeuten: g_{Ca} = potential- und zeitabhängige Veränderung der Membranleitfähigkeit für Ca^{2+}; β und γ sind membranpotentialabhängige Koeffizienten; die Exponentialzahlen 0, 1, 2 bedeuten die Ordnungszahlen der Kinetiken.

ziumdepots (sarkoplasmatisches Retikulum (SR), Mitochondrien). Die aus diesen intrazellulären Speichern verfügbare Menge an Aktivatorkalzium bestimmt das Ausmaß der Kontraktion. Eine über das transversale tubuläre System (T-System) ins Zellinnere fortgeleitete Membranerregung führt zur Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Dieser Prozeß - einmal angestoßen - verläuft sodann autoregenerativ (Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung)(FORD und PODOLSKY, 1970; FABIATO und FABIATO, 1972, 1973, 1975). Zur Muskelerschlaffung wird das ausgeschüttete Aktivatorkalzium in das SR zurückgebunden (EBASHI, 1961; HASSELBACH und MAKINOSE, 1961). Diese Rückbindung verläuft in einem zweistufigen Prozeß (WEBER, 1971a, b; MAKINOSE, 1971): Eine primäre Ca^{2+}-Aufnahme im Mittelteil des SR und eine sekundäre Speicherung in den lateralen Zisternen des longitudinalen Systems (WINEGRAD, 1965, 1968, 1970). Die Kalziumabgabe aus der Myokardzelle erfolgt als Austauschdiffusion mit extrazellulären Na^{+}-Ionen (REUTER und SEITZ, 1968; GLITSCH, REUTER und SCHOLZ, 1970).

Mit diesem Modell können kontraktile Phänomene (transitorische Treppen, Pausenverhalten, Kontraktionen bei variierenden extrazellulären Kalziumkonzentrationen) vorhergesagt und zum Teil erklärt werden (KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974). Desweiteren ist es mit Hilfe dieses Modells möglich, spezifische Angriffspunkte von Pharmaka aufzudecken, die in die EMK eingreifen und charakteristische inotrope Wirkmuster besitzen (BAYER, HENNEKES, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975a).

Aus der Vielzahl der heute bekannten zellulären und subzellulären Ca^{2+}-Bewegungen im Rhamen der elektromechanischen Koppelung begründen sich neue Forderungen für die Untersuchung herzwirksamer Pharmaka. Es genügt nämlich nicht, nur die üblichen Meßgrößen, wie isometrische Gipfelspannung oder dp/dt unter der Einwirkung dieser Substanzen zu erfassen. Als Endprodukte aller koppelungswirksamen Prozesse kommt diesen Parametern nur eine beschränkte Aussagekraft zu. Wirkunterschiede und

Angriffspunkte werden vielfach erst dann erkennbar, wenn ein möglichst vollständiges Wirkmuster inotroper Pharmakaeffekte bestimmt wird; beispielsweise sollten folgende kontraktile Ereignisse untersucht werden: Amplituden-Frequenzbeziehungen im steady state, Amplituden-Pausenbeziehung, Treppenphänomene bei plötzlichem Frequenzwechsel, Kraft-Geschwindigkeits-Zeit- und Kraft-Geschwindigkeits-Längenbeziehung. Die Forderung nach einer ähnlich umfassenden Analyse wurde schon von BLINKS und KOCH-WESER (BLINKS und KOCH-WESER, KOCH-WESER und BLINKS, 1961, 1963) erhoben.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb versucht werden, auf der Basis des Modells der EMK-Prozesse der Herzmuskelzelle (KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974) ein Analyse-Programm anzuwenden, das geeignet ist, die inotropen Wirkmuster der Ca-antagonistischen Substanz Nifedipine zu differenzieren und möglicherweise Rückschlüsse auf die Art des Eingriffs auch dieser Substanz in die koppelungswirksamen Prozesse (siehe Abb. 2) zu ziehen.

Dieses Programm beinhaltet neben der Erfassung der stationären Amplituden-Frequenzbeziehung, der Amplituden-Pausenbeziehung und transitorischer Phänomene zusätzlich Untersuchungen über das kontraktile Verhalten von Papillarmuskeln unter der Einwirkung von Nifedipine und variierenden Kalzium-Konzentrationen. Auf der Grundlage einer solchen umfassenden Wirkmusteranalyse kann dann die Klassifizierung und die Abgrenzung dieser Substanz gegenüber anderen Ca-Antagonisten erfolgen. Sollten sich die Wirkbilder unter der Einwirkung analoger Derivate von Nifedipine gleichen, so darf jedoch ein gemeinsamer Wirkmechanismus für diese Stoffe angenommen werden; unter dieser Voraussetzung wäre eine Bedingung für anschliessende quantitative Struktur-Wirkungsanalysen (siehe Kapitel 1.3) erfüllt.

1.2 ZUR CHEMIE UND PHARMAKOLOGIE DER 1,4-DIHYDROPYRIDIN-VERBINDUNGEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON NIFEDIPINE

Seit der Entdeckung und Aufklärung von Strukturen und Mechanismen der wasserstoffübertragenden Nicotinamiddinnucleotide NAD - NADH (ab 1930) sind nur wenige pharmakologische Studien mit strukturentsprechenden Dihydropyridin (DHP)-Derivaten unternommen worden (PHILLIPS, PHILLIPS und RANDALL, 1944, 1949: analgetische bzw. Curare-ähnliche Wirkung; MARKS, HUNTER, TERNER und SCHNECK, 1965: Beeinflussung der Porphyrinbildung; ROSS, 1966: Antitumoreigenschaften).

Eine solche Sachlage ist erstaunlich, da diese Enzyme (als Dehydrogenasen oder Oxyreduktasen) bei zahlreichen zellulären biochemischen Reaktionen eine zentrale Stellung einnehmen. Bekanntlich ist ein möglicher Pharmaka-Angriffsort dort, wo in biochemische Vorgänge mit künstlich abgewandelten Anfangs-, Zwischen- oder Endprodukten enzymatischer Reaktionswege eingegriffen werden kann (z.B. Sulfonamide, Cytostatika).

Ein grosses pharmakologisches Interesse an der Stoffklasse der DHP-Verbindungen erwachte erst, als die Arbeitsgruppen um BOSSERT, VATER (Belgium Patent 1967; BOSSERT und VATER, 1971) und um LOEV (LOEV, EHRREICH und TEDESCHI, 1972) die starke blutdrucksenkende Wirkung einiger DHP-Derivate beschrieben.

In den folgenden Ausführungen sind die prinzipiellen Struktur-Wirkungsüberlegungen dieser beiden Arbeitsgruppen angeführt: B. LOEV ging bei seinen pharmakologischen Überlegungen vom Grundgerüst der 1,4-Dihydropyridinstruktur aus, wie sie von NADH vorgegeben ist (Abb. 3, Weg A). Für eine blutdrucksenkende Wirkung wurden dabei von LOEV die folgenden Strukturen als essentiell bzw. als besonders wirksamkeitssteigernd erachtet (LOEV, GOODMAN, SNADER, TEDESCHI und MACKO, 1974):

1) reduzierte Pyridinstruktur,
2) unsubstituierter Stickstoff (sekundärer Stickstoff),
3) 4-heteroaryl- bzw. 4-phenyl-substituierte DHP-Derivate,
4) aplanare Anordnung der beiden Ringe (durch ortho-substituierten Aromaten),
5) 2,6-dimethyl- sowie 3,5-Carbonsäureestergruppen.

BOSSERT und VATER fanden das gleiche Struktur-Wirkungsprinzip auf gänzlich anderem Weg: sie wandelten systematisch das Gerüst des Khellinmoleküls, also einer bekannten gefäßerweiternden Substanz, ab (Abb. 3, Weg B). Für diese beiden Autoren sind die essentiellen Molekülstrukturen (BOSSERT, 1975):
1) stabile Estergruppen (erschwerte Verseifung durch sterische Hinderung, vinyloge amido-carboxyl-Ester),
2) aplanare Ringanordnung,
3) reduzierte Pyridinstruktur.

Alle angeführten Strukturmerkmale besitzt die Substanz Nifedipine, die den Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung darstellt. Nifedipine ist die bisher einzige DHP-Verbindung, über die ausführliche physikochemische und pharmakologische Berichte vorliegen. Diese Berichte sollen soweit zusammenfassend dargestellt werden, wie sie für das Thema der Dissertation wichtig und erwähnenswert erscheinen: So besitzt Nifedipine eine überaus große Hydrophobie. Die Bindungskonstante ($K_1 \cdot 10^{-3}$, 1/mol) beträgt für Nifedipine - bezogen auf Humanalbumin - 6.9, während für andere vergleichbare herzaktive Pharmaka wie Nitroglycerin 3.4, für Verapamil 0.19 angegeben werden (ROSENKRANZ, SCHLOSSMANN und SCHOLTAN, 1974). Für den pharmakologisch inaktiven Hauptmetaboliten von Nifedipine, der durch zwei oxidative Schritte sowie Esterhydrolyse entsteht (MEDENWALD, SCHLOSSMANN und WÜNSCHE, 1972), verringert sich diese Konstante auf 2.3.

Über die Wirkungen von Nifedipine auf isolierte Herzpräparate liegen unter anderem folgende Untersuchungsergebnisse vor: ein ausgeprägt negativ inotroper Effekt, der bereits in nie-

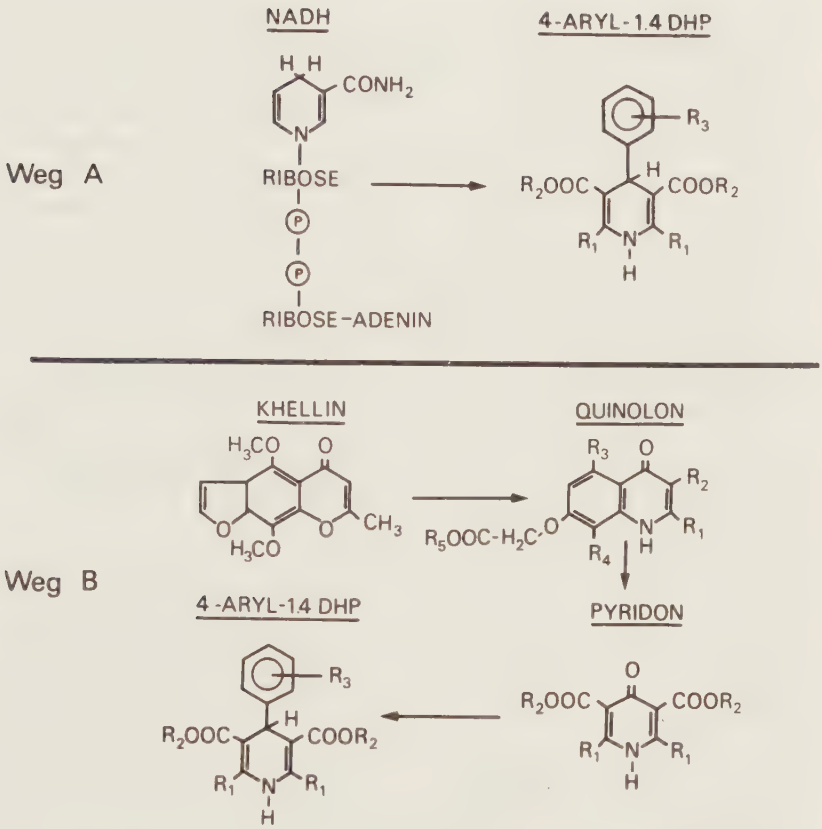


Abb. 3: Skizzierung des Entwicklungsweges einer neuen pharmakologisch aktiven Substanzklasse, der 4-Aryl-1,4-DHP-Verbindungen. Von den verschiedenen Ausgangsstoffen NADH und Khellin wird eine gleiche Wirkstruktur abgeleitet.

drigen Dosierungen auftritt (VATER, KRONEBERG, HOFFMEISTER, KALLER, MENG, OBERDORF, PULS, SCHLOSSMANN und STOEPEL, 1972; FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972; STRAUER, 1974; REFSUM und LANDMARK, 1975; BAUMANN, 1976), eine geringe Verkürzung des Aktionspotentials (AP), während die Aufstrichsgeschwindigkeit nicht verändert wird (FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972) sowie eine Beeinflussung des Reizleitungssystems und der Spontanfrequenz - im Sinne einer negativ dromotropen und chronotropen Wirkung (HASHIMOTO, TAIRA, CHITA und HASHIMOTO, 1972; TAIRA und NARIMATSU, 1975). Am durchströmten Meerschweinchenherzen führt Nifedipine zu einer Erhöhung der Koronardurchströmung, zu sinkendem Ventrikeldruck und zur Abnahme der maximalen Ventrikeldruckanstiegsgeschwindigkeit (RAFF, KOSCHE und LOCHNER, 1972). GRÜN und FLECKENSTEIN (1972) wiesen Ca-antagonistische Effekte von Nifedipine an isolierten Streifenpräparaten von Rinder- und Schweinekoronarien nach. Sie konnten zeigen, daß die Ca^{2+}-induzierte Spannung des K^{+}-depolarisierten Gewebes durch Nifedipine aufhebbar ist. Bei diesem Versuchsmodell ist Nifedipine etwa 40mal wirksamer als die Ca-Antagonisten Verapamil und Prenylamin. Versuche mit Meerschweinchenpapillarmuskeln ergaben, daß Nifedipine am kontraktilen Muskelpräparat ca. 10mal stärker negativ inotrop wirkt als Verapamil (FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972). Kultivierte Einzelzellen aus embryonalen Hühnerherzen verlieren unter der Einwirkung von Nifedipine ihre mechanische Aktivität, die elektrische Automatie der Zellen bleibt jedoch unverändert erhalten (KAUFMANN, TRITTHART, ROST und FLECKENSTEIN, 1970).

1.3 DIE QUANTITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE (QSWA)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll der Versuch unternommen werden, für eine Reihe von analogen Verbindungen aus der Stoffklasse der Dihydropyridinverbindungen quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen. Es wird angestrebt, eine Vorhersage über die Wirkungsstärke nicht-getesteter Verbindungen zu ermöglichen sowie eine Aussage darüber zu treffen, welche physikochemischen Parameter im Falle der Dihydropyridinverbindungen für die Wirkung auf das Myokard entscheidend sind. Mit dieser Analysenmethode kann weiterhin auch eine nähere, statistisch abgesicherte Aussage über die physikochemischen Eigenschaften des Arzneimittel-Rezeptors formuliert werden.

Die ursprüngliche Idee, die allen quantitativen Struktur-Wirkungsanalysen zugrunde liegt, ist die Überlegung von BROWN und FRAZER (1869), daß eine mathematische Beziehung zwischen biologischer Wirkung und chemischer Pharmakastruktur besteht. Sie formulierten vor mehr als 100 Jahren die folgende Gleichung:

$$\Phi = f\ (C)$$

Mit dieser Gleichung wird zum Ausdruck gebracht, daß ein meßbarer biologischer Effekt Φ eine Funktion der chemischen Pharmakaeigenschaft C ist. MEYER (1899) und OVERTON (1899) konnten als erste diese Hypothese durch experimentelle Ergebnisse bestätigen. Sie fanden, daß die Verteilung eines narkotischen Wirkstoffes zwischen den Phasen Olivenöl - Wasser parallel zu der Verteilung des Wirkstoffes zwischen der wässrigen exo-Biophase und dem Wirkort, der lipophilen Membran, verlief. Die von ihnen gemessene narkotische Wirkung der untersuchten Pharmaka war umso stärker, je mehr sich diese Verbindungen in der lipophilen Phase Olivenöl anreicherten.

Erst in den sechziger Jahren erfuhren diese Arbeiten ihre direkte Fortsetzung durch HANSCH und FUJITA (HANSCH, MUIR, FUJITA, MALONEY, GEIGER und STREICH, 1963; HANSCH und FUJITA, 1964; FUJITA, IWASA und HANSCH, 1964). Sie leiteten mit ihren Veröffentlichungen über die Bedeutung des Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten P für die biologische Wirksamkeit von Pharmaka die Ära der modernen QSWA ein.

Das Ziel jeder QSWA besteht darin, die Größe des meßbaren biologischen Effektes durch Änderungen der physikochemischen Parameter innerhalb einer analogen Arzneistoffserie zu erklären und mit einer bestimmten statistischen Wahrscheinlichkeit die Wirkung nicht-getesteter Verbindungen ausschließlich über die Kenntnisse dieser Parameter vorherzusagen. Durch einfache oder multiple Regressionsanalysen wird der - oder werden die - für die Wirkung entscheidende(n) Parameter aufgezeigt, indem neben den lipophilen auch die elektronischen und die sterischen Substituenteneinflüsse mit der Wirkung korreliert werden. Die Brauchbarkeit dieser Analysenmethode wurde bereits von vielen Forschergruppen belegt (zusammenfassende Darstellung siehe FRANKE und OEHME, 1973) und stellt ein überaus wichtiges neues Teilgebiet der modernen Pharmakologie dar.

Die Grenzen dieser Methode sind dann erreicht, wenn sich biologische Wirkstoffe pharmakokinetisch komplex verhalten oder ihre Effekte an verschiedenen Rezeptoren ausüben. Völlig neue pharmakologisch wirksame Molekültypen lassen sich auch mit diesem Verfahren nicht entdecken.
Neben der Methode der Hansch-Analyse existieren heute eine Reihe weiterer Modelle, die pharmakologische Struktur-Wirkungsbeziehungen auf eine mathematische Basis stellen wollen (z.B. ZAHRADNIK und CHVAPIL, 1960). Da diese Verfahren jedoch bisher meist weniger erfolgreich quantitative Relationen zwischen Pharmakaeffekt und physikochemischer Eigenschaft beschreiben konnten, wurde in der vorliegenden Arbeit die allgemein anerkannte und auch verbreitete Methode der Hansch-Analyse verwendet.

1.4 DIE AUFGABENSTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Folgende Ziele sollen durch Untersuchungen kontraktiler Verhaltensweisen von Papillarmuskeln und durch die Anwendung der Hansch-Analyse erreicht werden:

1) eine differenzierte Analyse des inotropen Wirkmusters von Nifedipine zu erstellen,

2) die Wirkung von Nifedipine gegenüber anderen Ca-Antagonisten abzugrenzen,

3) Aussagen über mögliche Angriffspunkte dieser Substanz im Rhamen der EMK zu treffen,

4) den Hauptmetaboliten von Nifedipine auf pharmakologische Eigenwirkung zu prüfen,

5) ein lipophiles Verteilungsmuster aller Testsubstanzen zu erarbeiten,

6) eine qualitative Struktur-Wirkungsanalyse für die DHP-Derivate durchzuführen,

7) eine quantitative Struktur-Wirkungsanalyse von analogen Dihydropyridinverbindungen zu erstellen,

8) essentielle Molekülstrukturen für die negativ inotrope Nifedipinewirkung aufzufinden.

2. METHODIK UND UNTERSUCHTE SUBSTANZEN

2.1 DIE MUSKELPRÄPARATE

Katzen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 1.4 und 2.5 kg wurden unter leichter Äthernarkose getötet. An die Thorakotomie schloß sich die schnelle Exzision und die sofortige Überführung der Herzen in ein Präparationsbad an. Dieses Bad enthielt sauerstoffgesättigte Tyrodelösung von 32° C. Nach Eröffnen des rechten Ventrikels entlang der Septumgrenze erfolgte die Präparation der Papillarmuskeln, an denen sowohl ein Teil der Tricuspidalklappe als auch ein etwa reiskorngroßes Stück Ventrikelwand belassen wurde. An diesem Gewebe konnte der Muskel am Hebel zur Kontraktionsübertragung und an einer Halterung im Versuchsbad ohne Beschädigung des Muskelgewebes befestigt werden. Es wurden nur Papillarmuskeln gleichförmiger, zylindrischer und verzweigungsloser Form verwendet. Die Muskellängen betrugen zwischen 6-9 mm und die Durchmesser zwischen 0.5 bis 1.1 mm. Die genauen Muskelmaße wurden mit Hilfe eines optischen Eichgitters bestimmt, welches sich unmittelbar unterhalb des Präparates im Versuchsbad befand. Nach Inkubation der Muskeln in das Versuchsbad wurden die Präparate vor Versuchsbeginn ca. $1^1/_2$ Stunden bei einer Reizfrequenz von 30/min äquilibriert. Die Vorbelastung, gegen die sich die Muskeln kontrahierten, betrug 0.7 p/mm^2.

Für die anschließenden Versuche wurden nur solche Muskeln verwendet, die eine isotone Verkürzungsamplitude von mindestens 20% ihrer Ausgangslänge erreichten und keine Spontanaktivität zeigten.

2.2 DIE LÖSUNGEN

Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (mM in Aqua bidest.): NaCl 136.9; KCl 2.68; $NaHCO_3$ 11.9; $CaCl_2$ 2.5; $MgCl_2$ 1.15; NaH_2PO_4 0.42; Glucose 10.0. Zur Elimination von Spuren von Schwermetallionen (toxische Wirkung!) wurden $2x10^{-5}$ M EDTA zugesetzt. Die Lösung wurde ständig von Carbogen (95% O_2 / 5% CO_2) durchperlt; das pH betrug 7.39 $\pm$ 0.02. Bei einer konstanten Temperatur der Tyrodelösung im Versuchsbad von 32° C wiesen die isolierten Katzenpapillarmuskeln unter den genannten Bedingungen im gesamten Untersuchungszeitraum (6 bis 12 Stunden) stabile Meßgrößen auf.

Nifedipine sowie seine Derivate wurden der Tyrodelösung aus täglich neu angesetzten Stammlösungen (2-10 mg in 1 ml Äthanol absol. p.a., Merck) in verdunkelten Räumen unter Natriumdampflicht zugesetzt.

2.3 DER VERSUCHSAUFBAU

2.3.1 Das Versuchsbad

Das Versuchsbad (siehe Abb. 4) bestand aus einer offenen Plexiglaskammer, die sich im mittleren Teil zu einer Rinne verengte. In diesem Bereich höchster Durchflußgeschwindigkeit war eine ausreichende Versorgung des Muskels (Glucose, O_2) gewährleistet. Das Perfusionsvolumen betrug 70 ml/min. Die Tyrodelösung wurde durch eine Schlauchpumpe (Verder VRK 225) rezirkuliert, wobei sie zwei Wärmeaustauscher passieren mußte. Der erste brachte sie kurz vor dem Eintritt in das Versuchsbad auf 32° C, während der zweite sie (zur ausreichenden O_2-Sättigung) auf 18° C abkühlte.

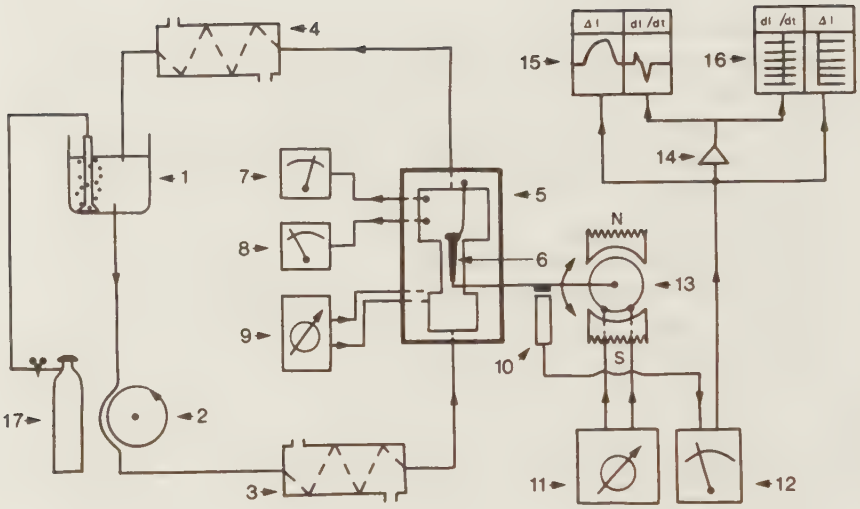


Abb. 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Es bedeuten im einzelnen: 1) Vorratsgefäß mit carbogenisierter Tyrode, 2) Schlauchpumpe, 3) und 4) Wärm- und Kühlsystem, 5) Versuchsbad, 6) Katzenpapillarmuskel, 7) digitale Temperaturregistrierung, 8) digitale pH-Registrierung, 9) Rechteck-Doppelreizgerät, 10) induktiver Wegaufnehmer = Hochfrequenzspule, 11) Spannungs-Stromumwandler, 12) Hochfrequenzmodem, zugehörig zur induktiven Wegmeßeinrichtung, 13) Drehspulinstrument mit Muskelhebel, 14) Differenzierer, 15) Oszilloskop, 16) Direktschreiber, 17) Carbogen-Vorratsflasche.
Weitere Erläuterungen zur Einsatz- und Funktionsweise der verwendeten mechanischen und elektronischen Versuchsplatzeinrichtungen siehe Text.

Die elektrische Reizung der Präparate erfolgte im Versuchsbad durch zwei muskelparallele Ag/AgCl-Elektroden mit dreifach schwellenwertigen Rechteckimpulsen von 0.3 ms Dauer (Rechteck-Doppelreizgerät, Hugo Sachs Elektronik).

2.3.2 Der Muskelhebel und die Wegmessung isotoner Kontraktionen

Als Muskelhebel zur Erfassung isotoner Kontraktionen diente ein 25 mm langer Aluminiumhebel. Dieser Hebel befand sich anstelle des Zeigers eines Drehspulinstruments (Kyoritsu KM-86), dessen Rückholfeder entfernt worden war. Die Papillarmuskeln wurden mit ihrem sehnigen Ende an der Hebelspitze, die im rechten Winkel zur Bewegungsebene in das Versuchsbad eintauchte, befestigt. Der Hebel war aus einer Dur-Aluminiumlegierung gefertigt und zur Reduktion seines Eigengewichts aufgebohrt. Eine Metallöse, die fest am Versuchsbad angebracht war, stellte die Halterung für die Muskelbasis - d.h. für das am Muskel belassene Stück Ventrikelwand - dar. Zur Abstufung der Muskelvorbelastung wurde der Drehinstrumentspule von einer elektronischen Steuereinheit ein variabler Gleichstrom zugeführt. Die Steuereinheit bestand im wesentlichen aus einem Spannungs-Stromwandler, der einen zur Eingangsspannung proportionalen Strom lieferte; der Strom am Ausgang des Verstärkers konnte durch ein bereits in Gramm geeichtes Potentiometer eingeregelt werden. An der Spitze des Hebelsystems erzeugte man bei Gleichstromfluß durch die Spule des Drehspulinstruments Ablenkkräfte bis 2 g.

Die Registrierung der Längenänderung des Papillarmuskels erfolgte über ein berührungsloses induktives Wegaufnehmersystem. Veränderte sich durch die Muskelkontraktion der Abstand einer auf dem Aluminiumhebel befestigten Aluminiumscheibe zu einer kleinen Spule mit ferromagnetischem Kern

(Induktivität 670 µH), die Teil eines Schwingkreises war (250 Hz), so veränderte sich auch die Spuleninduktivität. Die damit verbundene Frequenzänderung des Schwingkreises wurde in proportionale Gleichspannungsänderung übertragen. Das erhaltene Gleichspannungssignal wurde elektronisch linearisiert; der Linearitätsfaktor betrug über 4.5 mm Hebelauslenkung weniger als $\pm$1%. Die auf die jeweilige Muskellänge und jeweiligen Muskelquerschnitt normierten Analogsignale+) von isotoner (Δ l) und elektronisch differenzierter Verkürzung (dl/dt) wurden auf einem Oszilloskop (Tektronix Type R 564 B) kontrolliert und mit Hilfe eines Zweikanal-Direktschreibers (Watanabe WTR 281) aufgezeichnet.

2.4 DIE HANSCH-ANALYSE

2.4.1 Die mathematischen und statistischen Voraussetzungen

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, besteht ein Ziel der QSWA darin, die Einflüsse lipophiler, elektronischer und sterischer Substituenteneigenschaften einer analogen Verbindungsreihe auf die biologische Wirkung zu ermitteln. Die mathematische Grundlage bildet dabei das statistische Verfahren der einfachen oder der multiplen Regressionsanalyse. Diese Analyse untersucht die Zusammenhänge zwischen unabhängigen Einflußgrößen und einer abhängigen Zielgröße. Stellvertretend für alle anderen verwendeten Parameter läßt sich im Falle einer einfachen linearen Regression für R_M, einem Parameter für die Lipophilie, die folgende allgemeine Gleichung aufstellen:

+) Eine Signalspannung von 1 V entsprach 10% der Standardausgangslänge L_i. L_i selber ist definiert als die Muskellänge, die der Muskel nach der Äquilibrierungszeit (Vorbelastung 0.7 p/mm^2) einnimmt. Sie ist praktisch identisch mit der Ausgangslänge der aktiven Längen-Spannungsbeziehung l_{max}.

$$\log 1/C = a \cdot R_M + b \qquad (1)$$

Diese Gleichung beschreibt den Zusammenhang, der zwischen Wirkdosis C (stets ermittelt bei der Reizfrequenz 30/min) und physikochemischer Größe R_M besteht. In der Praxis verwendet man den logarithmierten Kehrwert der Wirkdosis (ED_{50}). Durch diese mathematische Ausdrucksweise nehmen steigende Wirksamkeiten positivere Werte an. Für jedes einzelne Derivat mit bekanntem R_M-Wert ergibt sich entsprechend aus der Gleichung (1):

$$\begin{aligned} \log 1/C_1 &= a \cdot R_{M_1} + b \\ \log 1/C_2 &= a \cdot R_{M_2} + b \\ &\vdots \\ \log 1/C_n &= a \cdot R_{M_n} + b \end{aligned} \qquad (2)$$

Damit liegt ein Gleichungssystem mit so vielen Gleichung vor, wie Derivate getestet worden sind. Es sollten allerdings bei jeder Regressionsanalyse die biologischen Werte von mindestens 4 bis 5 Derivaten - bezogen auf einen physikochemischen Parameter - ermittelt werden, da sonst die Gefahr von Zufallskorrelationen besteht (TOPLISS und COSTELLO, 1972). Die Unbekannten a und b werden durch die einfache Regressionsanalyse bestimmt. Sie stellen die Steigung a einer Geraden mit dem Schnittpunkt b auf der Y-Achse (log 1/C-Achse) dar, die nach der "Methode der kleinsten Quadrate" durch die Punktwolke der jeweiligen R_M, log 1/C-Wertepaare verläuft. Über die statistische Signifikanz einer solchen Analyse gibt die Standardabweichung (s) Auskunft.

Der ermittelte Korrelationskoeffizient, r, ist ein Maß für die Größe der Abhängigkeit zwischen log 1/C und R_M. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei der Wert 1 eine lineare, der Wert 0 hingegen keine Korrelation bedeutet.

Sollen bei der QSWA neben den lipophilen noch andere Einflüsse berücksichtigt werden, so wird die einfache lineare Regression zu einer multiplen Regression. Nach einem Postulat von HANSCH ergeben sich nun die Werte für log 1/C als Linearkombinationen aus den verschiedenen Parametertermen. Die allgemeine Gleichung (1) erweitert sich sinngemäß etwa um die numerischen Beiträge der elektronischen Parameter σ und den sterischen Parameter E_s. Sie lautet dann:

$$\log 1/C = a \cdot R_M + b \cdot \sigma + c \cdot E_s + d \qquad (3)$$

und kann entsprechend zu der Gleichung (2) für die einzelnen Derivate formuliert werden. Ein in das Rechenprogramm eingeführter Normierungsschritt erlaubt den direkten Vergleich der erhaltenen Regressionskoeffizienten und gestattet damit eine direkte Aussage über den jeweiligen Einfluß der Parameter auf die Wirkung. Dieser Schritt wird bedeutsam bei variierenden Größenordnungen der Parameterwerte und setzt sich beispielsweise für R_M wie folgt zusammen:

$$R_M' = \frac{R_M - \bar{R}_M}{s_{R_M}} \qquad (4)$$

R_M' = normierter R_M-Wert
$\bar{R}_M$ = Mittelwert aller verwendeten R_M-Werte
s_{R_M} = Standardabweichung aller verwendeten R_M-Werte

Die bei der Hansch-Analyse erhaltenen partiellen Regressionskoeffizienten und partiellen Korrelationskoeffizienten werden nach dem Student t-Test überprüft. Desweiteren wird das multiple Bestimmheitsmaß B (= Quadrat des Gesamtkorrelationskoeffizienten) errechnet, welches prozentual den Anteil der Substituenteneinflüsse auf die Varianz der Wirkung zum Ausdruck bringt; ebenso erfolgt eine statistische

Auswertung der 95%-Konfidenzintervalle für die multiplen Regressionskoeffizienten. Mit einem abschließenden F-Test wird die Signifikanz der Gesamtkorrelation überprüft. Dieser Test setzt sich zusammen aus: 1) der Anzahl der Derivate N
2) der Anzahl der Parameter P
3) dem Bestimmheitsmaß B

und lautet:

$$F = \frac{(N - P - 1)B}{P(1 - B)} \qquad (5)$$

Die entsprechenden Werte für die F-Verteilung finden sich in der Literatur (LINDER, 1964). Sie erlauben das Maß der Signifikanz der gesamten Analyse (p) zu bestimmen.

Sind durch die einfache oder die multiple lineare Regressionsanalyse die Unbekannten a, b, c, d, usw. bestimmt, liegen weder Überkorrelationen noch Interkorrelationen (LEO, HANSCH und CHURCH, 1969; CRAIG, 1971) vor, und ist die Signifikanz der Analyse $p > 0.05$, so kann mit der aufgelösten Gleichung (3) die Wirkung nicht getesteter Substanzen der gleichen analogen Verbindungsreihe unter Verwendung ihrer bekannten Substituentenparameter mit definierter statistischer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden.

2.4.2 Die physikochemischen Parameter der quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse

Nachdem bereits in der Einleitung die Ziele und die Möglichkeiten der QSWA erwähnt worden sind, soll in den folgenden Abschnitten beschrieben werden, wie diese Analysenmethode am Beispiel der DHP-Derivate angewendet werden kann. Dazu ist zunächst erforderlich, die wichtigsten Parameter aufzuzählen, die rein numerisch die lipophilen, elektronischen und sterischen Substituenteneigenschaften erfassen (eine ausführliche Literaturübersicht findet sich bei TUTE, 1971):

log P, π, R_M: Konstanten, die in einem komplexen biologischen System Eiweiß- und Rezeptorbindungsphänomene erfassen; in ihrer quadrierten Form gelten diese Terme als lipophile Transportfaktoren, die pharmakokinetischen Aspekten Rechnung tragen.

σ, F, R, μ, μ^2, P_E: Konstanten, die elektronische Moleküleigenschaften beschreiben. Die bekannte Hammett-Konstante (σ) ist im Rahmen der QSWA ein Parameter, der Ionen-Dipol, Ionen-Ionenwechselwirkungen bzw. Wasserstoffbindungen bei Rezeptorinteraktionen erfassen soll.Er kann modifiziert sein zu σ^- bei Resonanzinteraktionen oder zu σ^+ bei Konjugationseffekten, etwa mit Carbonylgruppen. Die numerischen Werte von F, R beinhalten nur induktive Faktoren oder alle Resonanzwechselwirkungen (SWAIN und LUPTON, 1968), während das Gruppendipolmoment (μ) bzw. die Elektronenpolarisierbarkeit (P_E) zur Deutung von Dipol-Dipol-, Dipol-Ionenwechselwirkungen zwischen Substituent und Rezeptor herangezogen wird.

UV, IR, NMR, $E_{1/2}$: Experimentell bestimmbare Größen aus der Spektroskopie (UV, IR, NMR) und der Polarographie ($E_{1/2}$). Sie stellen weitere Möglichkeiten zur Erfassung elektronischer Einflüsse dar. Sie sind im Rahmen einer QSWA dann verwendbar, wenn mit diesen spezifischen Größen Moleküleigenschaften ausgedrückt werden, die auch für die biologische Wirkung mit entscheidend und mit den Vorgängen zwischen Pharmakon und Rezeptor vergleichbar sind.

MV, V_w, r_w, E_s: Stellen sterische Terme dar (MV = Molekularvolumen, V_w = van der Waals Volumen, r_w = van der Waals Radius, E_s = Taft-Konstante). Sie sollen die sterischen Aspekte berücksichtigen, die z.B. bei der Anpassung von Pharmaka an Rezeptoren entscheidende Bedeutung haben. Die Taft-Konstante erfaßt insbesondere die sterischen Effekte, die bei intra- oder intermolekularer Hinderung einer Reaktion

oder Bindung auftreten. Sie ist direkt proportional den jeweiligen van der Waals Radien der Substituenten.

pKa: Die pKa-Werte von Pharmaka können im Falle von ionisierten Testsubstanzmolekülen einen direkten Zusammenhang zwischen Wirkung und Dissoziationskonstanten beschreiben.

Für die aufgestellten Korrelationen wurden Parameter verwendet, die möglichst vielseitig Substituenteneigenschaften erfassen und für die in der Literatur umfangreiche numerische Daten vorhanden sind:

Erfaßte Eigenschaft	Symbol, Bezeichnung	Literaturangabe
lipophil	π , π^2, R_M, ΔR_M, $\Delta R_M{}^2$	NORRINGTON et al.(1975) CRAIG (1971) FUJITA et al. (1964)
elektronisch	σ , $\sigma^\star$, F , R , μ , μ^2	NORRINGTON et al.(1975) QUINN (1975) CRAIG (1971) SMYTH (1955)
sterisch	MV , E_s , V_w , r_w	EXNER (1967) KUTTER et al. (1969/69) SEYDEL et al. (1976) BONDI (1964/68) TAFT jr. (1956) CRAIG (1971)

2.5 DIE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER LIPOPHILIEKONSTANTEN R_M

Für eine Arbeit, die sich zum Ziel gesetzt hat, quantitative Beziehungen zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Wirksamkeit pharmakologisch aktiver Substanzen zu erarbeiten, ist die Bestimmung von Lipophiliekonstanten unerläßlich. Da die meisten der vorliegenden Stoffe eine außergewöhnlich hohe Lipophilie aufweisen, konnte das übliche Oktanol/Wasser Verteilungsverfahren von HANSCH (HANSCH und FUJITA, 1964; LEO, HANSCH und ELKINS, 1971) nicht angewendet werden. Stattdessen wurden mit verteilungschromatographischen Methoden die sogenannten R_M- bzw. ΔP_M-Werte bestimmt. Diese R_M-Werte, die ebenso wie die Lipophiliewerte von HANSCH einen Ausdruck für die relative Fettlöslichkeit von homologen Substanzen darstellen, werden nach der folgenden Formel berechnet (BATE-SMITH und WESTALL, 1950):

$$R_M = \log (1/R_f - 1)$$

Der ΔR_M-Wert ist die dem π-Wert von HANSCH analoge Substituentenkonstante. Für ihn gilt:

$$\Delta R_M = (R_M)_x - (R_M)_o$$

R_f = Quotient aus der Entfernung Substanz-Startpunkt und der Entfernung Fließmittelfront-Startpunkt; es ist ein für jede Substanz charakteristischer Wert, der durch spezifische Verteilungs-, Adsorptions- und Ionenaustauschprozesse zwischen der Substanz, dem Fließmittel und der stationären Phase zustande kommt.

$(R_M)_x$ = R_M-Wert der substituierten Substanz

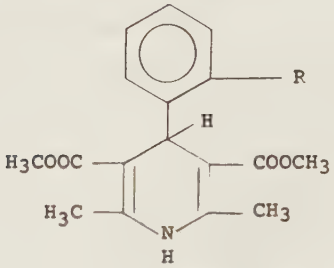
$(R_M)_o$ = R_M-Wert der unsubstituierten Substanz

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte dünnschichtchromatographische Verfahren beruht auf der Phasenumkehrmethode: die normalerweise hydrophile polare, stationäre Phase der DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F-254, Merck) wurde durch

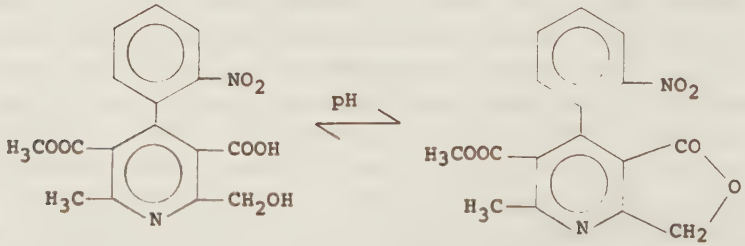
Auftragen einer stationären lipophilen unpolaren Phase ersetzt. Zu diesem Zweck wurden die Fertigplatten in einer DC-Wanne mit einer 5%igen Paraffin (DAB_6)-Äthyläther (DAB_7)-Lösung imprägniert. Die Paraffinimprägnierung (= unpolare lipophile Phase) fand durch Aufsteigen der Paraffin-Ätherlösung, die Entfernung des Lösungsmittels Äther durch Abdampfen bei 50° C statt (Trockenschrank, 4 Stunden). Als Fließmittel für die Phasenumkehrchromatographie diente ein Gemisch aus 48 Teilen Aqua bidest., 50 Teilen Methanol (p.a., Merck) und 2 Teilen einer Ammoniumacetat-Pufferlösung (0.2 M). Die Fließmittelzusammensetzung wurde nach der in der Literatur (BIAGI, GANDOLFI, GUERRA, BARBARO und CANTELLI-FORTI, 1975) beschriebenen Methode bestimmt. Der Bereich der Methanolkonzentration zur Erzielung definierter R_M-Werte lag zwischen 40-60 %. In diesem Verdünnungsbereich herrschte zwischen R_M-Werten und Methanolkonzentration ein annähernd lineares Verhältnis. Die polare mobile Phase war mit der aufgetragenen lipophilen stationären Phase nicht mischbar und besaß ein pH von 7.3.

Fließmittel anderer Zusammensetzung (etwa mit Aceton oder Äthanol) wiesen in Vorversuchen keine bessere Trennung der zu untersuchenden Stoffe auf bzw. verschlechterten sie erheblich. Alle Substanzen (in absolutem Äthanol, Merck, 1 mg/25 ml gelöst), wurden punktförmig mit Kapillaren auf ihre markierten Startpunkte aufgetragen. Nach 2.5 Stunden Laufzeit in gesättigter Fließmittelatmosphäre bei 22° C und nach Erreichen einer Laufhöhe von 12 cm wurden die Platten aus der DC-Wanne entnommen und 10 min im Trockenschrank bei 60° C getrocknet. Die Detektion der Substanzen und die Auswertung des Chromatogramms geschah durch Anregung der fluoreszierenden Trennschicht mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm). Dabei traten alle in diesem Bereich absorbierenden Substanzen - soweit sie keine eigene Fluoreszenz aufwiesen - als dunkle Zonen auf der grünlich fluoreszierenden Trägerschicht deutlich sichtbar hervor. Die anschließende Bestimmung der R_M- und ΔR_M-Werte erfolgte nach den angegebenen Formeln; alle R_M-Werte leiteten sich als Mittelwerte aus mindestens drei einzeln bestimmten R_F-Werten ab.

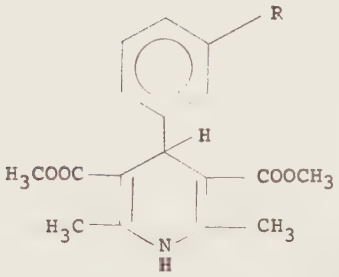
2.6 DIE VERSUCHSSUBSTANZEN



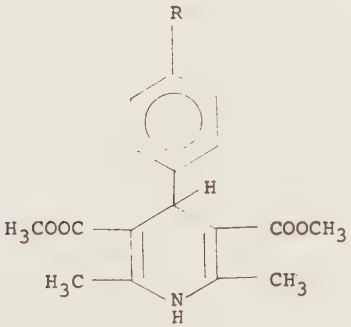
R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
NO_2	VS - 001	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346.4
CH_3	VS - 002	$C_{18}H_{21}NO_4$	315.4
OCH_3	VS - 003	$C_{18}H_{21}NO_5$	331.4
SCH_3	VS - 004	$C_{18}H_{21}NO_4S$	347.4
CN	VS - 005	$C_{18}H_{18}N_2O_4$	326.4
CF_3	VS - 006	$C_{18}H_{18}NO_4F_3$	369.4
Cl	VS - 007	$C_{17}H_{18}NO_4Cl$	335.8



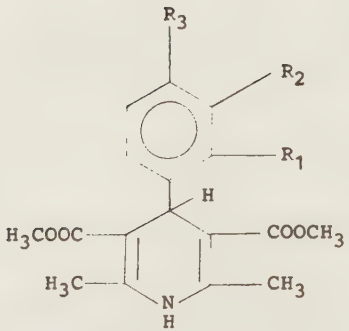
Hauptmetabolit (VS-100) ——— Nebenmetabolit von Nifedipine (VS-001)



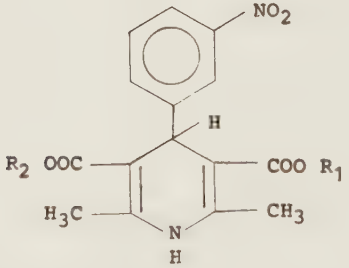
R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
OCH_3	VS - 008	$C_{18}H_{21}NO_5$	331.4
NO_2	VS - 009	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346.4
CF_3	VS - 010	$C_{18}H_{18}NO_4F_3$	369.4
Cl	VS - 011	$C_{17}H_{18}NO_4Cl$	335.8
H	VS - 012	$C_{17}H_{19}NO_4$	301.4
N_3	VS - 013	$C_{17}H_{18}N_4O_4$	342.4



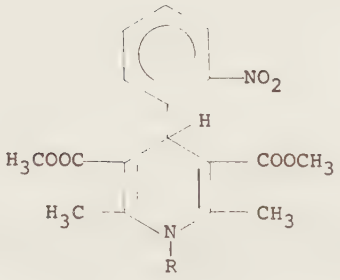
R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
Cl	VS - 014	$C_{17}H_{18}NO_4Cl$	335.8
CH_3	VS - 015	$C_{18}H_{21}NO_4$	315.4
OCH_3	VS - 016	$C_{18}H_{21}NO_5$	331.4
NO_2	VS - 017	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346.4



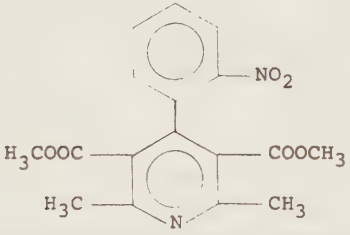
R_1	R_2	R_3	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
NO_2	H	Cl	VS - 018	$C_{17}H_{17}N_2O_6Cl$	380.8
H	NO_2	OCH_3	VS - 019	$C_{18}H_{20}N_2O_7$	376.4
OCH_3	H	NO_2	VS - 020	$C_{18}H_{20}N_2O_7$	376.4
H	OH	OCH_3	VS - 021	$C_{18}H_{21}NO_6$	347.4



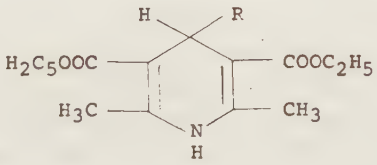
R_1	R_2	Code-Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
$(CH_2)_2$ -O-C_3H_7	$(CH_2)_2$-O-C_3H_7	VS - 022	$C_{25}H_{34}N_2O_8$	490.6
CH_3	C_2H_5	VS - 023	$C_{18}H_{20}N_2O_6$	360.4
C_2H_5	$CH(CH_3)_2$	VS - 024	$C_{20}H_{24}N_2O_6$	388.4
$(CH_2)_2$-O-CH_3	$CH(CH_3)_2$	VS - 025	$C_{21}H_{26}N_2O_7$	420.5
CH_3	CH_3	VS - 009	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346.4



R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
CH_3	VS - 200	$C_{18}H_{20}O_6N_2$	360.4



R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
-	VS - 300	$C_{17}H_{16}O_6N_2$	344.3



R	Code - Nr.	Summenformel	Molekular-gewicht
CH_3	VS - 400	$C_{14}H_{21}O_4N$	267.3

3 ERGEBNISSE

3.1 DIE QUALITATIVEN UND QUANTITATIVEN BESTIMMUNGEN INOTROPER WIRKUNGEN VON NIFEDIPINE

3.1.1 Die Kinetik der Nifedipinewirkung

Zur exakten Bestimmung der Wirkstärke eines Pharmakons ist es wichtig zu wissen, zu welchem Zeitpunkt nach der Zugabe ein Wirkgleichgewicht erreicht wird. Daher wurde zu Beginn der pharmakologischen Untersuchungen am isolierten Katzenpapillarmuskel die negativ inotrope Wirkung von Nifedipine ($3x10^{-7}$ M) in Abhängigkeit von der Einwirkdauer bestimmt. Die Abb. 5 zeigt, daß die negativ inotrope Wirkung von Nifedipine praktisch sofort einsetzt, danach exponentiell ansteigt und nach ca. 60 Minuten ihr Wirkungsmaximum erreicht. Die Halbwertszeit dieses Wirkungsverlaufs beträgt 12 $\pm$ 2 min. Eine kurzzeitige transitorische Zunahme der Kontraktionsamplituden - wie etwa im Falle mancher anorganischer Ca-Antagonisten - wurde unter $3x10^{-7}$ M Nifedipine nicht beobachtet (Reizfrequenz 30/min).

Alle Messungen kontraktiler Ereignisse wurden daher immer 60 min nach Substanzzugabe durchgeführt.

Da die Einstellung eines Wirkgleichgewichtes auch von äußeren Faktoren (wie z.B. der Reizfrequenz) beeinflußt werden kann, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Abhängigkeit des Wirkverlaufes von der Reizfrequenz untersucht. Bei diesen Studien zeigte sich, daß die Kinetik der negativ inotropen Nifedipinewirkung unabhängig von der gewählten Reizfrequenz ist. Der Verlauf des Wirkeintritts bei den Reizfrequenzen 6, 12 und 60/min bis zum Gleichgewichtswert ist praktisch identisch mit der Kinetik der Nifedipinewirkung der Abb. 5 (Reizfrequenz 30/min). Der dargestellte Wirkverlauf (Abb. 5) wird auch dann eingehalten, wenn der Muskel nicht gereizt wird.

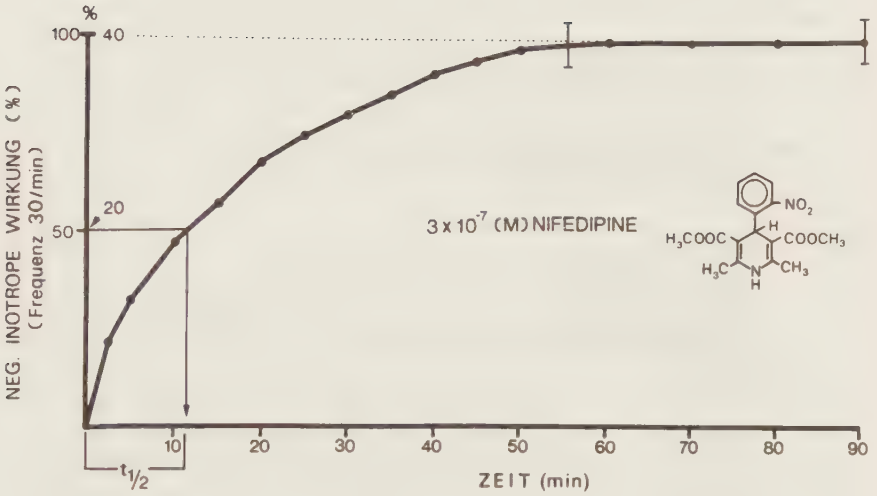


Abb. 5: Die Kinetik der Nifedipinewirkung an isolierten Katzenpapillarmuskeln. Die gewählte Dosis von $3x10^{-7}$ M entspricht einer 40%igen absoluten Wirkung (bezogen auf die vollständige Dosis-Wirkungskurve von Nifedipine, siehe Abb.13). Die Halbwertszeit der Wirkungskinetik, $t_{1/2}$, wurde graphisch ermittelt (Reizfrequenz 30/min, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, N=5).

Im Gegensatz zur Kinetik des Wirkeintritts führte die Perfusion mit Nifedipine-freier Lösung (nach vorheriger einstündiger Inkubation mit $3x10^{-7}$ M Nifedipine) zu einer sehr langsam verlaufenden Teilrestitution der isotonen Kontraktionsamplituden. Auch durch intensive Bestrahlung der Präparate mit UV-Licht war eine Restitution auf höchstens 80% der Kontrollwerte in Nifedipine-freier Lösung innerhalb 180 min zu erreichen (UV-Licht induzierte Oxidation des DHP-Ringes von Nifedipine zum Pyridinring und damit Umwandlung in eine pharmakologisch weniger wirksame Struktur (MEDENWALD, SCHLOSSMANN und WÜNSCHE, 1972)).

3.1.2 Das Treppenverhalten und die Amplituden-Frequenzbeziehung unter der Einwirkung von Nifedipine

Wichtige Merkmale inotroper Wirkmuster erhält man aus der Amplituden-Frequenzbeziehung (AFB) im steady state (sogenannte stationäre AFB) bzw. aus den bei Frequenzwechsel zu beobachtenden transitorischen Phänomenen, den Treppen. Die Abb. 6 zeigt Originalregistrierungen, wie sie zur Bestimmung derartiger Amplituden-Frequenzbeziehungen aufgenommen wurden.

Wie aus dem Beispiel der Kontrollregistrierung in Abb. 6 (Ca^{2+} 2.5 mM) deutlich wird, reagiert der rhythmisch gereizte Papillarmuskel bei plötzlicher Erhöhung der Reizfrequenz charakteristischerweise immer mit einer kurzen negativen Treppe von 1-2 Schlägen, und einem anschließenden treppenförmigen Ansteigen der Kontraktionsamplituden, die nach etwa 8-15 Schlägen einen neuen, relativ höheren steady state erreichen. Bei den hier dargestellten Versuchen wird die Reizung auf den jeweiligen Frequenzstufen 6, 12, 30, 60/min für 4 min fortgesetzt. Der am Ende jeder Frequenzperiode erlangte

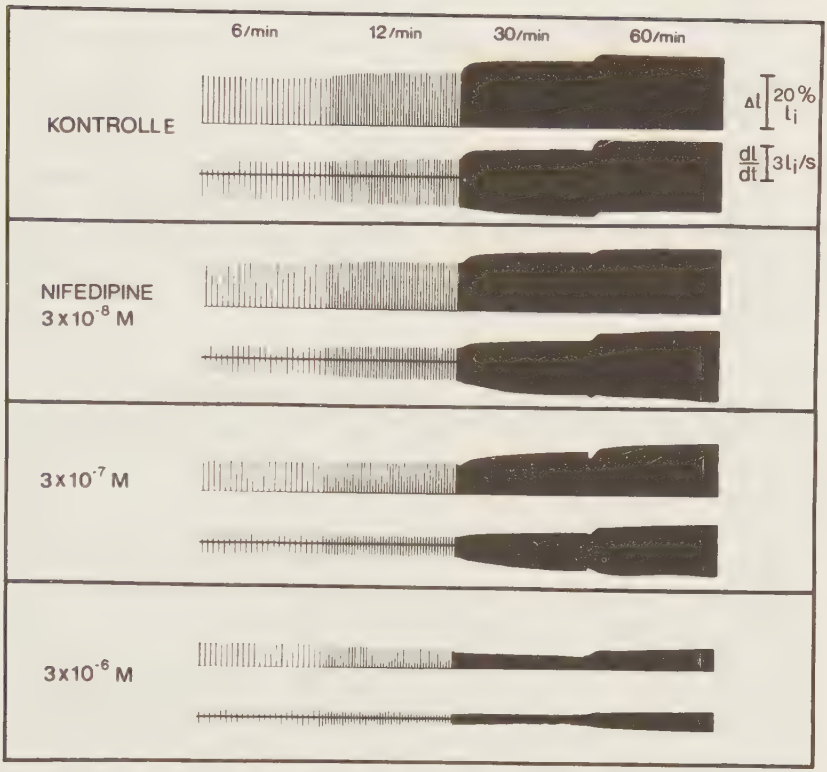


Abb. 6: Originalregistrierungen isotoner Kontraktionen eines isolierten Katzenpapillarmuskels. Die Reizfrequenz wurde schrittweise von 6/min auf 12, 30 und 60/min erhöht. Unter Kontrollbedingungen wird in den untersuchten Frequenzbereichen die jeweilige Frequenzerhöhung mit einem treppenförmigen Ansteigen der Kontraktionsamplituden beantwortet bis sich nach 8-15 Schlägen ein neuer Gleichgewichtszustand einstellt. Unter der Einwirkung von Nifedipine werden die Kontraktionsamplituden weitgehend frequenzunabhängig gesenkt und die dynamischen Übergänge bei Frequenzerhöhung betroffen (kurzdauernde negative Treppe von 2-4 Schlägen). Für die isotone Verkürzungsgeschwindigkeit werden qualitativ gleichartige Effekte registriert (nähere Erklärung siehe Text).

steady state-Amplitudenwert wird dann zur Bestimmung der stationären AFB herangezogen. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, kommt es bei Nifedipinekonzentrationen $> 3 \times 10^{-7}$ bis 6×10^{-7} M zu einer deutlichen Depression der Kontraktionsamplituden bei allen gewählten Reizfrequenzen. Die typische stationäre AFB des isolierten Papillarmuskels bleibt unter der Wirkung von Nifedipine im Gegensatz zu anderen Ca-antagonistischen Hemmstoffen (BAYER, RODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976) weitgehend erhalten. Eine quantitative Auswertung von 10 derartigen Versuchen zeigt die Abb. 7.

Die dynamischen Übergänge nach den Frequenzwechseln 6, 12, 30, 60/min sind dagegen von Nifedipine in charakteristischer Weise beeinflußt. So zeigen die unter Kontrollbedingungen erhaltenen monophasischen Treppen unter Substanzeinwirkung $> 3 \times 10^{-8}$ M ein biphasisches Bild: Bei plötzlicher Frequenzerhöhung kommt es zu einer kurzdauernden negativen Treppe (2-4 Schläge). Im Anschluß an diese Treppe steigen die Kontraktionsamplituden zu einem neuen steady state wieder an. Qualitativ gleichartige stationäre und transitorische Effekte werden auch bei der Registrierung der isotonen Verkürzungsgeschwindigkeit (dl/dt) unter Nifedipineeinfluß beobachtet.

Diese Versuchsergebnisse zum kontraktilen Wirkbild von Nifedipine können nicht nur mit den Modellvorstellungen der EMK in Einklang gebracht werden, sondern es können aus diesen theoretischen Modellvorstellungen wiederum weitere experimentelle Schritte begründet werden: So wird im programmierten Modell für die EMK der Myokardzelle (KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974) die für den Papillarmuskel typische AFB damit erklärt, daß mit zunehmender Reizfrequenz der durchschnittliche Füllungsgrad des 1-Kompartimentes (intrazelluläre Speicherorte, siehe Abb. 2) durch transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstrom während der AP-Dauer steigt; bei Frequenzerhöhung kann somit mehr Aktivatorkalzium ausgeschüttet werden und die Kontraktionsamplituden steigen.

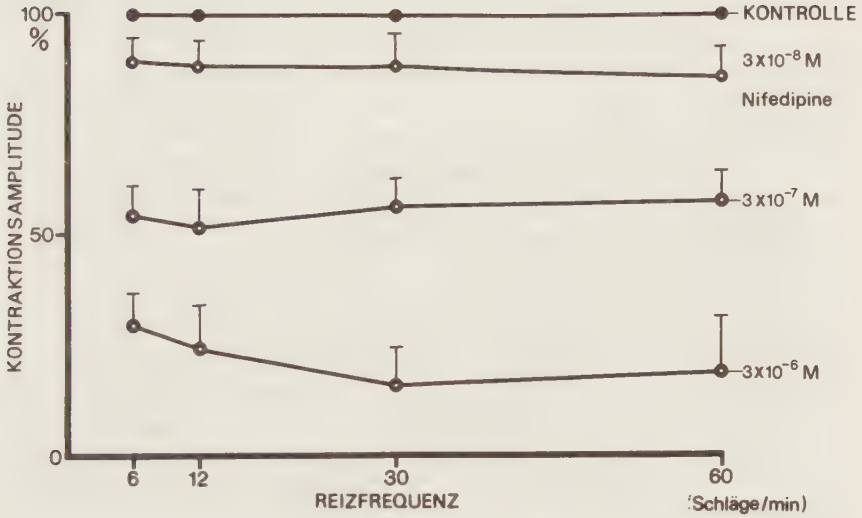


Abb. 7: Amplituden-Frequenzbeziehung für steady state Kontraktionen isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln. Die Änderungen der steady state Amplituden unter Nifedipine wurden für jede Reizfrequenz prozentual auf die Kontrollamplituden = 100% bezogen. In den Dosisbereichen $3x10^{-8}$ bis $3x10^{-7}$ M reduziert Nifedipine die Kontraktionsamplituden relativ gleichmäßig bei allen Reizfrequenzen; bei hohen Dosen > $3x10^{-6}$ M tritt eine geringe, statistisch jedoch nicht signifikante Betonung der negativ inotropen Wirkung bei 30 und 60/min auf ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, N=10).

Wird der potentialabhängige transmembranäre Ca^{2+}-Einwärtsstrom aber gehemmt, so resultiert hieraus eine geringere Füllung der intrazellulären Speicherorte und eine entsprechend geringere Kontraktionsamplitude für alle gewählten Frequenzen. Diese gleichmäßige frequenzunspezifische Senkung der Kontraktionsamplituden wäre demnach im Falle der qualitativ gleichartigen Nifedipinewirkung als Folge einer Hemmung des potentialabhängigen transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstromes anzusehen. Die zu solchen wirkmechanistischen Überlegungen kongruenten experimentellen Ergebnisse müßten folgerichtig in Ca^{2+}-verminderter Tyrodelösung erhalten werden, weil mit dieser Versuchsbedingung die einfachste Simulation eines gehemmten transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstroms dargestellt wird. Desweiteren müßte die AFB unter Nifedipine durch Erhöhung des Kalziumgehaltes der Tyrodelösung vollständig restituierbar sein.

Die Abb. 8 und 9 zeigen die Ergebnisse von entsprechenden Versuchen: Wird der Kalziumgehalt des Perfusionsmediums unter den physiologischen Wert von 2.5 mM auf 1.8 bzw. 1.0 mM gesenkt, so findet eine annähernd gleichmäßige frequenzunabhängige Senkung der AFB statt (siehe Abb. 8, Bildteil A). Im Falle einer Erhöhung bis auf 10 mM weist die AFB einen sogenannten "negativen Slope" auf, d.h. daß bei geringeren Reizfrequenzen (6, 12/min) die Kontraktionsamplituden stärker zunehmen als bei höheren Reizfrequenzen (30, 60/min). Im Bildteil B der Abb. 8 sind die Amplituden-Frequenzbeziehungen dargestellt, die am gleichen Muskel und bei gleichem Kalziumgehalt wie im oberen Bildteil, nun aber unter $3x10^{-7}$ M Nifedipine, erhalten wurden. Es zeigt sich, daß die AFB bei vermindertem Kalziumgehalt ebenso frequenzunspezifisch beeinflußt wird wie unter Kontrollbedingungen. Eine komplette Wiederherstellung der AFB durch Anhebung der extrazellulären Kalziumkonzentration bis auf 10 mM ist jedoch nicht möglich.

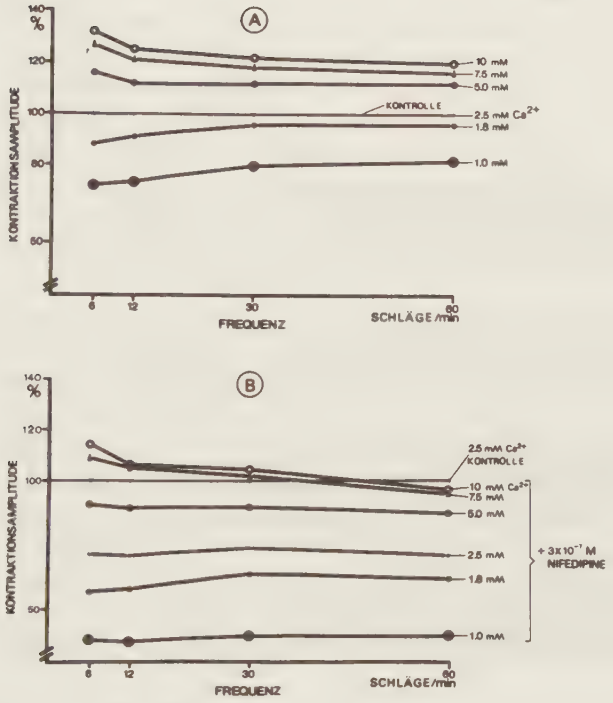


Abb. 8: Bildteil A: Graphische Darstellung von Amplituden-Frequenzbeziehungen eines Papillarmuskels unter erhöhtem und vermindertem extrazellulären Kalziumgehalt.
Bildteil B: Amplituden-Frequenzbeziehung am gleichen Muskel und unter den gleichen Kalziumgehalten wie im oberen Bildteil, nun aber unter $3x10^{-7}$ M Nifedipine. Es finden sich weitgehend übereinstimmende Wirkbilder zwischen vermindertem Kalziumgehalt und Nifedipinewirkung. Eine vollständige Wiederherstellung der AFB ist jedoch auch mit 10 mM Ca^{2+} nicht möglich.

So erreichen die Kontraktionsamplituden bei der Frequenz 60/min selbst durch Erhöhung des Kalziumgehaltes über 10 mM hinaus (15 mM) nie das Kontrollniveau; auftretende Nachkontraktionen zeigen an, daß mit dieser Maßnahme keine komplette Restituierbarkeit der Kontraktionsamplituden erreicht werden kann. Zudem beobachtet man unter der Gabe von Nifedipine bei erhöhter extrazellulärer Kalziumkonzentration (>5 mM Ca^{2+}) eine geringere Versteilung des bereits physiologischerweise vorhandenen "negativen Slopes" der Amplituden-Frequenzbeziehung (siehe Abb. 8B).

Während die Wirkbilder der AFB zum einen unter Nifedipineeinfluß und zum anderen bei vermindertem Kalziumgehalt fast identisch sind, so weist doch die bereits beschriebene unvollständige Wiederherstellung der AFB darauf hin, daß die Nifedipinewirkung zwar weitgehend, jedoch nicht alleine durch die Hemmung des transmembranären potentialabhängigen Ca^{2+}-Einwärtsstroms zu erklären ist. Ein weiterer Unterschied, der zwischen der Nifedipinewirkung und der Auswirkung von Kalziumentzug auf die Kontraktionsamplitude von Papillarmuskeln auftritt, wird durch Vergleiche der zuvor beschriebenen charakteristischen Treppenphänomene sichtbar.

In der Abb. 9 sind die Originalregistrierungen der isotonen Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen (2.5 mM Ca^{2+}), partiellem Kalziumentzug (0.5 mM Ca^{2+}), erhöhtem extrazellulären Kalziumgehalt (10 mM Ca^{2+}) und Nifedipine ($3x10^{-7}$ M + 10 mM Ca^{2+}) dargestellt. Mit diesem Vergleich soll deutlich gemacht werden, daß Nifedipine das Treppenverhalten der Kontraktionsamplituden, insbesondere beim Frequenzwechsel von 30 auf 60/min, in anderer, bereits dargestellter und geschilderter Weise (siehe Kapitel 3.1.2) beeinflußt als dies unter bloßem Kalziumentzug geschieht. Durch die Erhöhung des Kalziumgehaltes auf 10 mM kann diese Nifedipinewirkung ebenfalls nicht völlig aufgehoben werden.

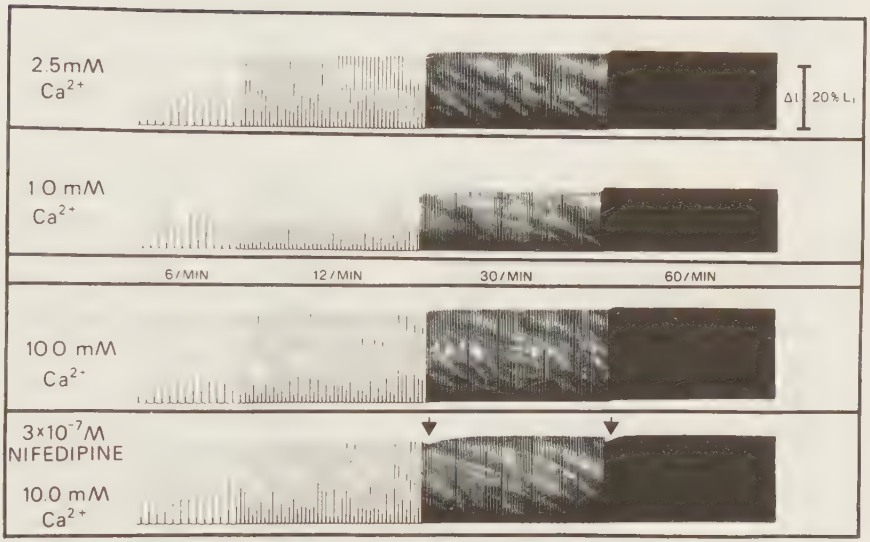


Abb. 9: Originalregistrierungen isotoner Kontraktionen eines Katzenpapillarmuskels unter Kontrollbedingungen (2.5 mM Ca^{2+}), erniedrigtem (1.0 mM Ca^{2+}) und erhöhtem (10 mM Ca^{2+}) extrazellulärem Kalziumgehalt. Die unterste Registrierung ($3x10^{-7}$M Nifedipine, 10 mM Ca^{2+}) zeigt, daß die Beeinflussung der transitorischen Phänomene durch Nifedipine (nach plötzlichem Frequenzwechsel 30-60/min) selbst von 10 mM Ca^{2+} nicht aufgehoben werden können (siehe Pfeilmarkierung).

3.1.3 Der Einfluß von Nifedipine auf die Amplituden-Pausenbeziehung

Im folgenden experimentellen Abschnitt wurde die Wirkung von Nifedipine auf die Amplituden-Pausenbeziehung isolierter Papillarmuskeln untersucht. Derartige Experimente geben Auskunft über die Verfügbarkeit intrazellulär gespeicherten Aktivatorkalziums und lassen möglicherweise Rückschlüsse auf den Angriff einer Ca-antagonistischen Wirksubstanz im Bereich dieser Speicherkompartimente zu.

Zum Verständnis der in Abb. 10 wiedergegebenen Originalregistrierungen ist es notwendig, sich die heute allgemein akzeptierten Grundmechanismen der elektromechanischen Koppelung am Warmblütermyokard zu vergegenwärtigen (siehe dazu auch Abb. 2). Nach diesen Vorstellungen wird kontraktionswirksames Ca^{2+} im Moment der Erregung aus den Myofibrillen-nahen Speichern des SR freigesetzt. Die Menge dieses Ca^{2+} bestimmt vermutlich in erster Linie das Ausmaß der Kraftentwicklung bzw. der Verkürzung und - mit gewissen Einschränkungen - der Verkürzungsgeschwindigkeit. Der erregungsbedingte transmembranäre Ca^{2+}-Einstrom seinerseits bestimmt im mittelfristigen Zeitintegral (etwa 6-10 Schläge) wiederum den Füllungszustand der Speicher (ANTONI, JAKOB und KAUFMANN, 1969; KAUFMANN, BAYER, FÜRNISS, KRAUSE und TRITTHART, 1974). Mit anderen Worten: Betrachtet man eine einzelne Kontraktion, so wird deren Amplitude durch diejenige Menge Kalzium bestimmt, die im Augenblick der Erregungsauslösung aus den intrazellulären Speichern freigesetzt werden kann. Die Ca^{2+}-Menge, die gleichzeitig während der Membranerregung über den "langsamen Kanal" in die Zelle gelangt, trägt nur zu einem geringen Teil (vermutlich weniger als 40%) zur Aktivierung der kontraktilen Elemente bei (siehe hierzu MORAD und GOLDMAN, 1973). Es ist daher erlaubt, aus der Amplitude einer Einzelkontraktion auf den instantanen Füllungszustand der retikulären Speicher zu schließen. Schaltet man also, wie in den Originalregistrie-

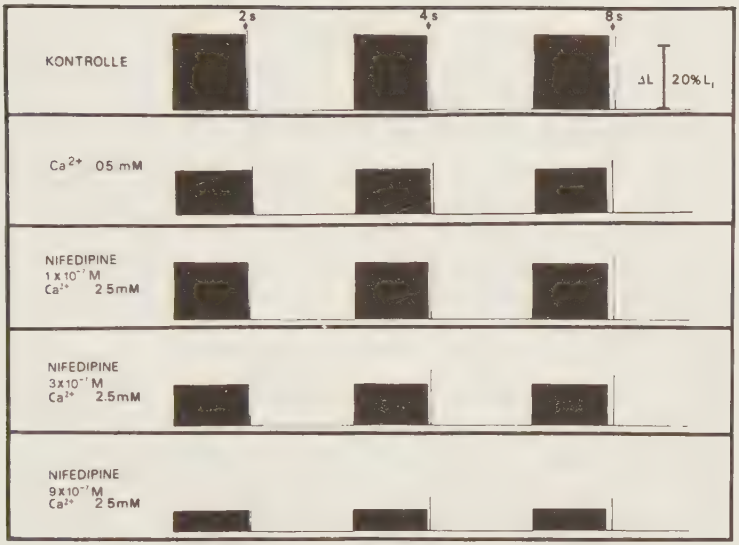


Abb. 10: Originalregistrierungen isotoner Kontraktionsamplituden unter Gleichgewichtsbedingungen (60/min) und je einer einzelnen Testkontraktion nach Unterbrechung der rhythmischen Reizung für 2, 4 und 8 s. Unter vermindertem Ca^{2+}-Gehalt (0.5 mM) sind die Test- und die steady state-Kontraktionen annähernd proportional reduziert. Unter der Einwirkung steigender Nifedipinedosen sind die Testkontraktionen - im Vergleich zu den Testkontraktionen unter Kontrollbedingungen und 0.5 mM Ca^{2+} - deutlich höher als die steady state Amplituden der vorausgehenden rhythmischen Reizung.

rungen der Abb. 10 gezeigt, eine stationär rhythmische Reizung plötzlich ab und löst - nach unterschiedlich langen Pausen - dann eine einzelne Testkontraktion aus, so ergibt deren Amplitude gegen die Pausenzeit aufgetragen, eine charakteristische Beziehung, die in etwa die Wiederverfügbarkeit (Restitutionskinetik) des intrazellulär gespeicherten Aktivator-Ca^{2+} wiederspiegelt (siehe auch HOMBURGER,SCHLEIERMACHER und ANTONI, 1973). Unter Kontrollbedingungen verläuft dieser Prozeß in seinem Anfangsteil nahezu exponentiell mit einer Zeitkonstanten von 300-400 ms, erreicht nach 2 s ein meist überschießendes Plateau und fällt anschließend langsam wieder ab. Wie die Originalregistrierungen der Abb. 10 zeigen, sind dementsprechend unter Kontrollbedingungen die Amplituden der Testkontraktionen - ausgelöst nach Reizpausen von 2, 4 und 8 s - gegenüber den Kontraktionen der Vorreizung leicht erhöht.

Unter dem Einfluß von Nifedipine kommt es zu einer Depression sowohl der Testkontraktionen als auch der vorausgehenden rhythmischen Kontraktionen. Dabei übertreffen die Amplituden der Testkontraktionen die der vorausgegangenen Kontraktionen stärker als unter Kontrollbedingungen. Betrachtet man darüberhinaus den gesamten Verlauf dieses Restitutionsvorganges, insbesondere unter Beachtung kürzerer (unter 2 s) Testintervalle, so findet man, daß Nifedipine den Restitutionsprozeß für die Wiederverfügbarkeit des intrazellulären Speicherkalziums offenbar verlangsamt (Abb. 11B) und das Plateau der Kurve (Pausenzeit > 2 s) senkt. Die Zeitkonstante des Restitutionsprozesses wird durch Nifedipine von 400 ms (Kontrolle) auf 880 ms ($3x10^{-7}$ M) bzw. auf 1000 ms ($9x10^{-7}$ M) verlängert (Mittelwerte aus 5 Versuchen).

Eine Verminderung des extrazellulären Kalziumgehaltes alleine bewirkt dagegen lediglich eine annähernd proportionale Reduzierung der steady state als auch der Testkontraktionen (Abb. 10, Ca^{2+} 0.5 mM). Dementsprechend verlaufen die Resti-

tutionskurven (Abb. 11A) unter partiellem Kalziumentzug wie die Kontrollkurve und die Zeitkonstante des Restitutionsprozesses ist nahezu unbeeinflußt.

Die Nifedipine-bedingte Verzögerung der intrazellulären Ca^{2+}-Wiederverfügbarkeit kann durch Erhöhung des extrazellulären Kalziumgehaltes nicht vollständig aufgehoben werden (Abb. 12). In dieser Situation bewirkt eine erhöhte Kalziummenge zwar eine komplette Restitution des Plateaus der Kurve, jedoch keine deutliche Wiederherstellung der Testkontraktionen nach kürzeren Testintervallen (< 1 s); d.h. die Zeitkonstante der Restitutionskinetik kann mit dieser Maßnahme nicht normalisiert werden.

Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten zum Wirkmechanismus von Nifedipine angenommen werden, daß der transmembranäre potentialabhängige Ca^{2+}-Einwärtsstrom frequenzunabhängig reduziert wird. Als Folge dieser Wirkung sinkt der maximale Füllungsgrad der intrazellulären Speicher. In wesentlich geringerem Maße sind auch intrazelluläre Prozesse der Kalziumwiederverfügbarkeit betroffen. Da durch Erhöhung des extrazellulären Ca^{2+}-Gehalts nicht alle Nifedipine-Effekte völlig aufhebbar sind, kann weiterhin ein einfacher kompetitiver Kalziumantagonismus für diese Substanz nicht angenommen werden (siehe dazu Diskussion, Kapitel 4.2).

3.1.4 Die Dosis-Wirkungsbeziehung für Nifedipine und den zugehörigen Hauptmetaboliten

Zu einer umfassenden Wirkmusteranalyse des inotropen Verhaltens isolierter Muskelpräparate gehört die Aufstellung der Dosis-Wirkungskurven für alle gewählten Reizfrequenzen. Nur so ist es über einen großen Dosisbereich möglich, verschiedene Ca-antagonistische Pharmaka auf ihre frequenzspezifische

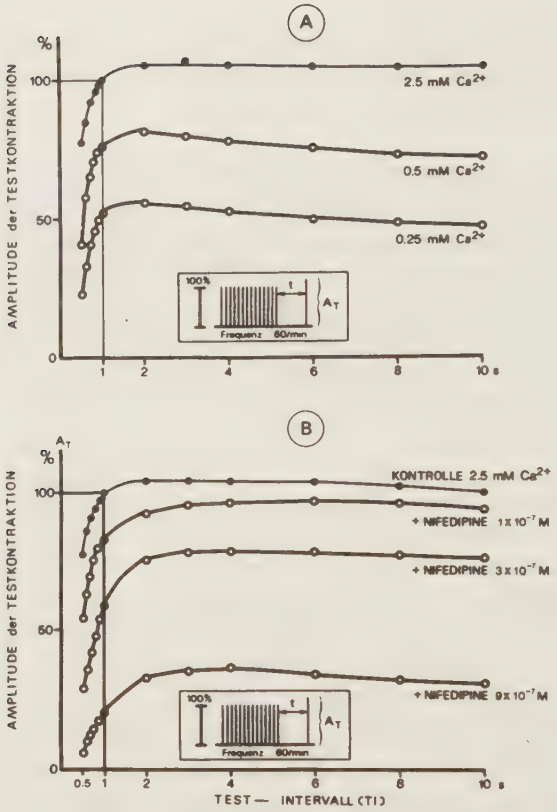


Abb. 11: Bildteil A: Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen; die Amplituden der Testkontraktionen wurden auf die steady state Amplitude unter Kontrollbedingungen (60/min) bezogen. Die Senkung von $(Ca^{2+})_o$ führt zu einer generellen Reduktion aller Testamplituden.
Bildteil B: Unter Nifedipine ist der Restitutionsvorgang gegenüber der Kontrollsituation verlangsamt sowie das Plateau der Kurve (Reizpausen > 2 s) gleichmäßig gesenkt. Eine schematische Darstellung des Versuchsablaufs ist in den jeweiligen Insets dargestellt. t = Pausenintervall, A_T = Amplitude der Testkontraktion. Nähere Erklärung siehe Text.

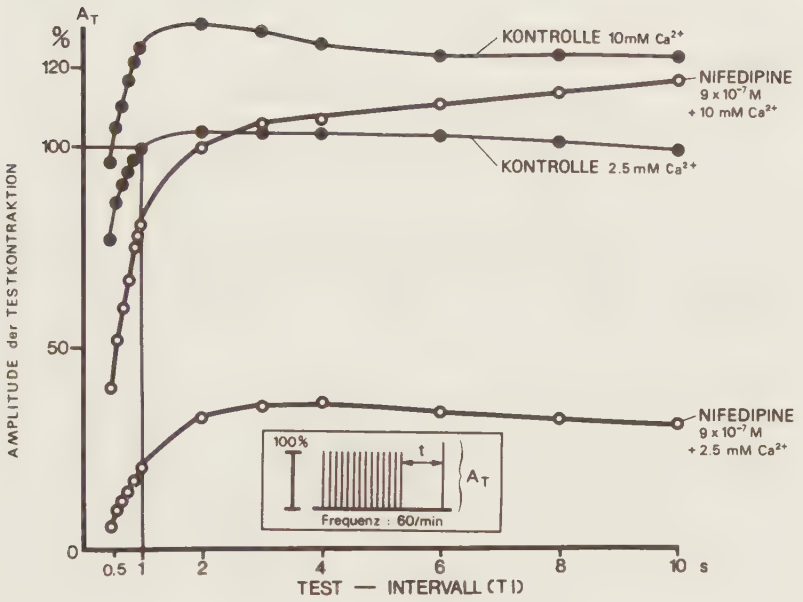


Abb. 12: Graphische Darstellung der Amplituden-Pausenbeziehung unter Nifedipine bei Variation von $(Ca^{2+})_o$. Die Zeitkonstante der Restitutionskinetik kann durch Erhöhung von $(Ca^{2+})_o$ auf 10 mM nicht normalisiert werden, da insbesondere die Amplituden nach kürzeren Testintervallen ($t < 1$ s) vergleichsweise geringe Zunahmen aufweisen. Das Plateau der Kurve (Reizpausen > 2 s) erreicht dagegen die Kontrollwerte.

Wirkung hin zu testen. Die in diesem Abschnitt durchgeführte Untersuchung des Hauptmetaboliten von Nifedipine soll dazu dienen, die pharmakologischen Eigenwirkungen dieser Substanz und eine mögliche Beeinflussung der Nifedipinewirkung festzustellen.

Bereits die Versuche zur Wirkung von Nifedipine auf die AFB ergaben eine nahezu frequenzunspezifische Beeinflussung der Kontraktionsamplituden unter den kumulativen Dosen $3x10^{-8}$, $3x10^{-7}$ und $3x10^{-6}$ M (siehe Abb. 7). Dementsprechend findet man auch einen fast identischen Verlauf der log. Dosis-Wirkungsbeziehung bei den einzelnen untersuchten Reizfrequenzen (siehe Abb. 13, obere Kurvenschar). Als ED_{50} wurden aus dieser Kurvenschar die folgenden Werte graphisch bestimmt:

Reizfrequenz	log. Dosis (M)
6	6.1×10^{-7}
12	4.7×10^{-7}
30	3.7×10^{-7}
60	5.1×10^{-7}

Tabelle 1: Zusammenstellung der ED_{50}-Werte von Nifedipine bei allen gewählten Reizfrequenzen (N=7).

Nifedipine kann bei niedrigen Reizfrequenzen in Konzentrationen von $> 3x10^{-11}$ bis $3x10^{-9}$ M eine leichte Erhöhung der isotonen Kontraktionsamplituden bewirken (siehe hierzu STRAUER, 1974). Dieser schwache positiv inotrope Effekt konnte jedoch nicht bei allen Experimenten nachgewiesen werden und ließ sich deshalb auch nicht statistisch absichern.

Der Hauptmetabolit wurde unter genau den gleichen experimentellen Methoden am isolierten Katzenpapillarmuskel getestet wie Nifedipine. Die freie, substituierte Pyridincarbonsäure (= Hauptmetabolit), die man durch Aufspaltung des Lactonringes aus dem Nebenmetaboliten im alkalischen Milieu erhält (siehe S. 28), wurde im Dosisbereich von $3x10^{-8}$, $3x10^{-7}$ und $3x10^{-6}$ M getestet. Die Auswertung der Versuche (N=6) ergab folgende Resultate (Abb. 13, untere Kurvenschar): Der Hauptmetabolit von Nifedipine bewirkt in Dosen < $3x10^{-8}$ M keine meßbaren Änderungen im kontraktilen Verhalten von isolierten Papillarmuskeln. In Konzentrationen von $3x10^{-7}$ bis $3x10^{-6}$ M tritt dann eine leichte, aber statistisch signifikante positiv inotrope Wirkung auf. Dieser positiv inotrope Effekt ist bei niedrigen Frequenzen (ca. +15 - 20%) ausgeprägter als bei höheren (ca. +5 - 10%). Da nur relativ geringe Mengen des Metaboliten zur Verfügung standen, wurde der Einfluß höherer Konzentrationen nur in einem Einzelversuch getestet. Dabei zeigte sich, daß im Dosisbereich $5x10^{-6}$ bis $5x10^{-5}$ M die positiv inotrope Wirkung des Hauptmetaboliten mit steigender Dosis abnimmt und die kontraktile Ausgangslage bei einer Konzentration von $5x10^{-5}$ M wieder erreicht wird bzw. der Bereich der negativ inotropen Wirkung beginnt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde sodann geprüft, ob der Metabolit die Nifedipinewirkung ($3x10^{-7}$ M) beeinflussen kann. Es zeigte sich, daß es nicht möglich war, durch nachträgliche Gabe des Hauptmetaboliten ($1x10^{-6}$ M) eine bereits eingetretene Nifedipinewirkung abzuschwächen. Auch eine Vorbehandlung mit dem Metaboliten ($1x10^{-6}$ M) konnte das Ausmaß der negativ inotropen Wirkung von Nifedipine nicht wesentlich reduzieren. Eine Kompetition zwischen Nifedipine und seinem Metaboliten um einen gemeinsamen Rezeptor ist nach diesen Versuchen ausgeschlossen.

Der Hauptmetabolit von Nifedipine wird in vivo durch folgende Reaktionen gebildet (MEDENWALD, SCHLOSSMANN und WÜNSCHE, 1972):

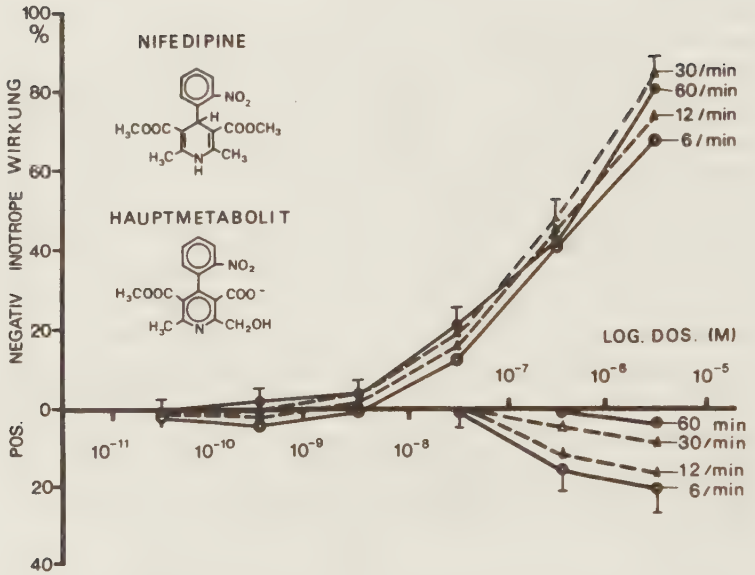


Abb. 13: Dosis-Wirkungskurven von Nifedipine (obere Kurvenschar, N=7) und des zugehörigen Hauptmetaboliten (untere Kurvenschar, N=6) für alle gewählten Reizfrequenzen. Während im gesamten Dosisbereich die negativ inotrope Wirkung von Nifedipine nahezu frequenzunspezifisch ist, ist die positiv inotrope Wirkung des Hauptmetaboliten bei geringeren Frequenzen 6, 12/min ausgeprägter als bei hohen Frequenzen 30, 60/min ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

1) Oxidation des Dihydropyridinringes,
2) Oxidation einer CH_3-Gruppe,
3) Spaltung einer Estergruppe.

Die stereochemisch geringfügigen, physikochemisch gesehen aber erheblichen Veränderungen des Nifedipinemoleküls führen zu völlig gegensätzlichen inotropen Wirkungen. Aus diesem Grund erscheinen Untersuchungen über qualitative und quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen mit weiteren Verbindungen dieser neuen Stoffklasse pharmakologisch aktiver Substanzen überaus wertvoll.

3.2 DIE WIRKMUSTERANALYSE VON NIFEDIPINE-ÄHNLICHEN VERBINDUNGEN

3.2.1 Die Versuche zur Auswahl und Eingrenzung der Testsubstanzen

Seit der Einreihung von DHP-Derivaten in die Klasse pharmakologisch aktiver Verbindungen, sind bis zum heutigen Tage weit mehr als 2000 Derivate dieser Substanzfamilie synthetisiert worden. Um eine sinnvolle Derivate-Auswahl aus dieser Vielzahl von Abwandlungsprodukten für qualitative und quantitative Struktur-Wirkungsanalysen zu treffen, wurden Wirkmusteranalysen von drei Stoffen erstellt, die zum Teil erhebliche Unterschiede untereinander und zur Vergleichssubstanz Nifedipine aufweisen.

Im einzelnen handelt es sich um die Substanz VS-400, VS-200 und VS-300 (Strukturformeln siehe 2.6). Im Gegensatz zur Bezugssubstanz Nifedipine liegt mit dem Stoff VS-400 eine DHP-Verbindung ohne substituierten Aromaten und mit verän-

derten Estergruppen vor; der einzige Unterschied zwischen Nifedipine und VS-200 besteht im methylierten (nun tertiären) Stickstoffatom des DHP-Ringes; mit der Substanz VS-300 steht eine zu Nifedipine räumlich identische Verbindung zur Verfügung, deren DHP-Ring aber zum Pyridinring oxidiert ist. Das Programm zur Untersuchung dieser Stoffe umfaßte - wie im Falle der Ausgangssubstanz - die Aufstellung von Dosis-Wirkungskurven, die Untersuchung der AFB, der transitorischen Phänomene und der Zeitkonstanten der Amplituden-Pausenbeziehung. Die Abb. 14 zeigt vergleichend die Dosis-Wirkungskurven wie sie nach kumulativen Gaben dieser Verbindungen am isolierten Papillarmuskel erhalten wurden. Die molaren ED_{50}-Werte sind in der folgenden Tabelle denen von Nifedipine gegenübergestellt:

Reiz-frequenz	VS-400 (A)	VS-200 (B)	VS-300 (C)	Nifedipine
6	2.6×10^{-6}	2.8×10^{-5}	1.5×10^{-5}	6.1×10^{-7}
12	3.0×10^{-6}	2.8×10^{-5}	1.6×10^{-5}	4.7×10^{-7}
30	6.4×10^{-6}	$>5 \times 10^{-5}$	4.7×10^{-5}	3.7×10^{-7}
60	1.9×10^{-5}	-	-	5.1×10^{-7}

Tabelle 2: Gegenüberstellung der molaren ED_{50}-Werte (bei allen Reizfrequenzen) von drei Abwandlungsprodukten und von Nifedipine. Die Strukturformeln dieser Testsubstanzen sind im Kapitel 2.6 aufgezeichnet.

Aus diesen Vergleichen geht hervor, daß Nifedipine um ein bis zwei Zehnerpotenzen wirksamer ist als die drei übrigen Substanzen.

Betrachtet man die Dosis-Wirkungskurven dieser Abwandlungsprodukte, so fällt auf, daß lediglich die Dosis-Wirkungskurve von VS-400 einen annähernd gleichen Verlauf zeigt wie die Kurve von Nifedipine (Abb. 14). Die Stoffe VS-200 und VS-300

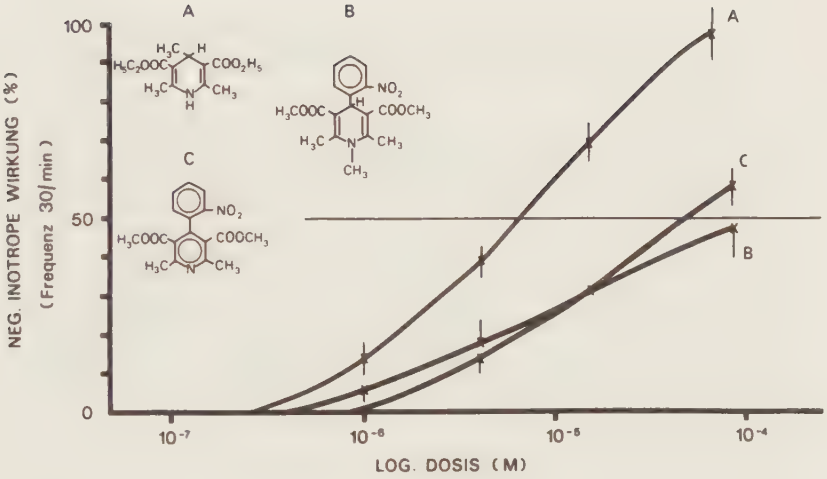


Abb. 14: Dosis-Wirkungskurven von Nifedipine-ähnlichen Verbindungen. Lediglich der Stoff A weist eine zu Nifedipine vergleichbare intrinsic activity auf (Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurve). Da die Stoffe B und C einen abweichenden Verlauf in ihren Dosis-Wirkungskurven zeigen, können Nifedipine-ähnliche Wirkungen von Verbindungen mit DHP-Ring und sekundärem N-Atom erwartet werden. Aus Gründen der Bildübersicht ist lediglich der Dosis-Wirkungskurvenverlauf bei einer Reizfrequenz (30/min) dargestellt ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, N=7).

dagegen besitzen nicht nur eine wesentlich geringere Affinität zu Rezeptorstrukturen, sondern auch einen abweichenden Verlauf in ihren Dosis-Wirkungsbeziehungen. Dies bedeutet, daß diese Stoffe eine andere intrinsic activity[+)] aufweisen als Nifedipine und die Substanz VS-400. Im Hinblick auf die Beeinflussung der AFB und der Restitutionskinetik ergaben sich folgende Versuchsresultate:

1) Kein Derivat verlängert die Restitutionskonstante (bzw. beeinflußt die transitorischen Treppen nach Frequenzwechsel) und
2) alle Derivate betonen die physiologisch vorhandene AFB, indem sie die Kontraktionsamplituden bei niedrigen Reizfrequenzen stärker reduzieren als bei hohen Reizfrequenzen.

Da nur die Substanz VS-400 einen zu Nifedipine vergleichbaren Dosis-Wirkungskurvenverlauf aufweist, wurden weitere qualitative und insbesondere quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen nur mit solchen Derivaten durchgeführt, die sowohl zu VS-400 als auch zu Nifedipine eine enge strukturelle Verwandtschaft besitzen.

3.2.2 Die qualitative Struktur-Wirkungsanalyse von Derivaten mit Substitutionsort am Aromaten

Aus den bislang dargestellten Versuchsergebnissen läßt sich vermuten, daß wirksame Derivate (mit Nifedipine ähnlichen Wirkbildern) dann erwartet werden können, wenn die para-Position des DHP-Ringes durch einen (substituierten) Phenylring besetzt ist. Zur weiteren Klärung dieser Frage wurde die negativ inotrope Wirkung analoger 4-aryl-1,4-DHP-Verbindungen untersucht, die 1) verschiedene ortho- oder meta- oder para-

---

[+)] Unter dem Begriff intrinsic activity wird die Fähigkeit eines Pharmakons verstanden, nach Anlagerung an den Wirkrezeptor einen Effekt auszulösen.

ständige Substituenten und 2) mehrfache Substituenten am Aromaten aufweisen. Mit diesen ausgewählten Verbindungen soll zum einen der Einfluß chemisch unterschiedlicher Substituenten und zum anderen die Bedeutung des Substitutionsortes für die biologische Wirkung geklärt werden.

3.2.2.1 Substituentenvariationen in ortho-Position

Wie aus der Abb. 15 hervorgeht, weisen alle Abwandlungsprodukte einen parallelen Dosis-Wirkungskurvenverlauf auf. Das Derivat VS-006 ($R=CF_3$) ist nach diesen Untersuchungen stärker negativ inotrop wirksam als Nifedipine. Die relativ geringste Wirkung besitzt die Substanz VS-003 ($R=OCH_3$) bzw. das Derivat VS-012 (R=H)(im Falle des Derivats VS-012 wäre der Wasserstoff als kleinster Substituent in ortho-Position anzusehen). Die molaren ED_{50}-Werte für alle gewählten Reizfrequenzen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Code-Nr.	6 / min	12 / min	30 / min	60 / min	N
VS-001	3.9×10^{-7}	3.5×10^{-7}	3.7×10^{-7}	3.5×10^{-7}	9
VS-002	2.2×10^{-7}	2.2×10^{-7}	3.8×10^{-7}	5.4×10^{-7}	9
VS-003	6.0×10^{-7}	6.9×10^{-7}	1.1×10^{-6}	2.0×10^{-6}	8
VS-004	4.9×10^{-7}	3.7×10^{-7}	3.5×10^{-7}	3.7×10^{-7}	6
VS-005	4.3×10^{-7}	3.7×10^{-7}	4.3×10^{-7}	4.6×10^{-7}	6
VS-006	1.9×10^{-7}	2.4×10^{-7}	1.9×10^{-7}	3.3×10^{-7}	8
VS-007	2.4×10^{-7}	2.4×10^{-7}	4.5×10^{-7}	6.6×10^{-7}	7
VS-012	5.3×10^{-7}	5.9×10^{-7}	1.2×10^{-6}	3.3×10^{-6}	6

Tabelle 3: Molare ED_{50}-Werte für ortho-substituierte Derivate bei 4 verschiedenen Reizfrequenzen.
N = Anzahl der Versuche.

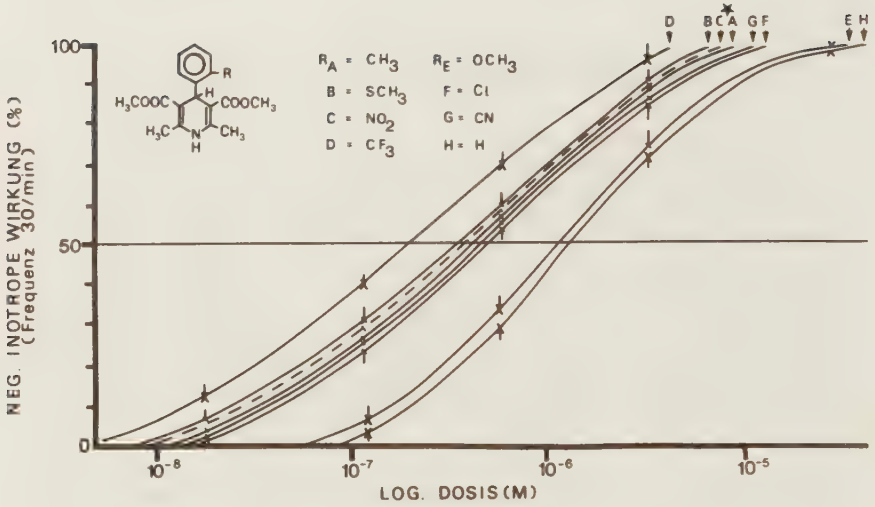


Abb. 15: Dosis-Wirkungskurven von Nifedipineanalogen; der Substitutionsort ist stets die ortho-Position am Aromaten. Die wirksamste Verbindung der getesteten 8 Derivate ist die Substanz VS-006 (R=2-CF_3). Alle Abwandlungsprodukte weisen bei unterschiedlichen Affinitäten zu Rezeptorstrukturen eine identische intrinsic activity auf. Der Kurvenverlauf der Ausgangssubstanz Nifedipine ($C^{\star}$) ist gestrichelt eingezeichnet ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Trotz recht unterschiedlicher Wirkstärke wird die AFB isolierter Katzenpapillarmuskeln unter diesen Derivaten qualitativ genauso beeinflußt wie unter Nifedipine. Bei einigen Versuchen konnte ein stärker negativ inotroper Effekt bei niedrigen als bei hohen Reizfrequenzen beobachtet werden (siehe Darstellung der Nifedipinewirkung Kapitel 3.1). Eine Umkehrung der AFB wie sie z.B. unter dem Ca-Antagonisten Verapamil stattfindet (BAYER, HENNEKES, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975a; BAYER, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975b), war in keinem Experiment zu beobachten. Darüberhinaus beeinflussen alle Abwandlungsprodukte - wie Nifedipine - die Restitutionskonstante. Im Dosisbereich von $3x10^{-7}$ bis $3x10^{-6}$ M wurden die folgenden Zeitkonstanten als Mittelwerte aus 5 Einzelversuchen bestimmt (Kontrolle = 400 ms):

Code-Nr.	VS-001	VS-002	VS-003	VS-004
τ (ms)	1000	700	650	1000

Code-Nr.	VS-005	VS-006	VS-007	VS-012
τ (ms)	1000	1150	800	500

Tabelle 4: Restitutionskonstanten von orthosubstituierten DHP-Derivaten. Kontrollwert = 400 ms. Nähere Erklärung diehe Kapitel 3.1.3.

Beim Vergleich der Zeitkonstanten mit den ED_{50}-Werten stimmt die Reihenfolge der Wirksamkeit der untersuchten Derivate weitgehend überein. Eine entsprechende Aussage kann ebenso für die Beeinflussung der transitorischen Treppen getroffen werden: Die Derivate, die die kleinsten ED_{50}-Werte und die höchsten Restitutionskonstanten aufweisen, verändern das Treppenverhalten stärker (entsprechend der Beschreibung der Nifedipinewirkung in Kapitel 3.1.2) als Derivate mit höheren ED_{50}-Werten und kleineren Restitutionskonstanten.

Da die graphischen Darstellungen dieser Derivate-Wirkmuster den Darstellungen entsprechen, die bereits in den Kapiteln über die Nifedipinewirkung gezeigt wurden, soll hier auf eine erneute Wiedergabe verzichtet werden.

3.2.2.2 Substituentenvariationen in meta-Position

Unter den Derivaten dieser Gruppe befinden sich Substanzen, die zum Teil die gleichen Substituenten am Aromaten aufweisen, die schon im Kapitel 3.2.2.1 beschrieben worden sind (OCH_3, NO_2, CF_3 und Cl). Die Auswahl solcher Derivate gestattet demnach einen direkten Vergleich der biologischen Wirkmuster von Strukturisomeren. In der Abb. 16 sind die Dosis-Wirkungskurven dieser Stoffgruppe dargestellt. Sie zeigen bis auf die Substanz VS-010 ($R=CF_3$) identische Kurvenverläufe wie sie auch von ortho-substituierten Derivaten erhalten wurden. Es fällt aber auf, daß die Kurvenschar im Vergleich zu den Kurven ortho-substituierter Derivate insgesamt nach rechts verschoben ist (siehe Abb. 15). Die Wirksamkeit der strukturisomeren meta-substituierten Verbindungen gegenüber den ortho-substituierten Substanzen ist demnach vermindert. Diese Aussage ist auch für die molaren ED_{50}-Werte aller gewählten Reizfrequenzen 6-60/min gültig:

Code-Nr.	6 / min	12 / min	30 / min	60 / min	N
VS-008	6.3×10^{-7}	7.2×10^{-7}	1.6×10^{-6}	4.4×10^{-6}	7
VS-009	4.9×10^{-7}	4.6×10^{-7}	5.8×10^{-7}	1.3×10^{-6}	8
VS-010	1.0×10^{-6}	-	-	-	7
VS-011	2.7×10^{-7}	3.5×10^{-7}	1.22×10^{-6}	1.9×10^{-6}	6
VS-013	7.0×10^{-7}	7.6×10^{-7}	1.4×10^{-6}	2.2×10^{-6}	6

Tabelle 5: Zusammenstellung aller molaren ED_{50}-Werte von meta-substituierten DHP-Derivaten. Im Falle der Substanz VS-010 konnten keine vergleichbaren ED_{50}-Werte für die Reizfrequenzen 12, 30 und 60/min ermittelt werden.

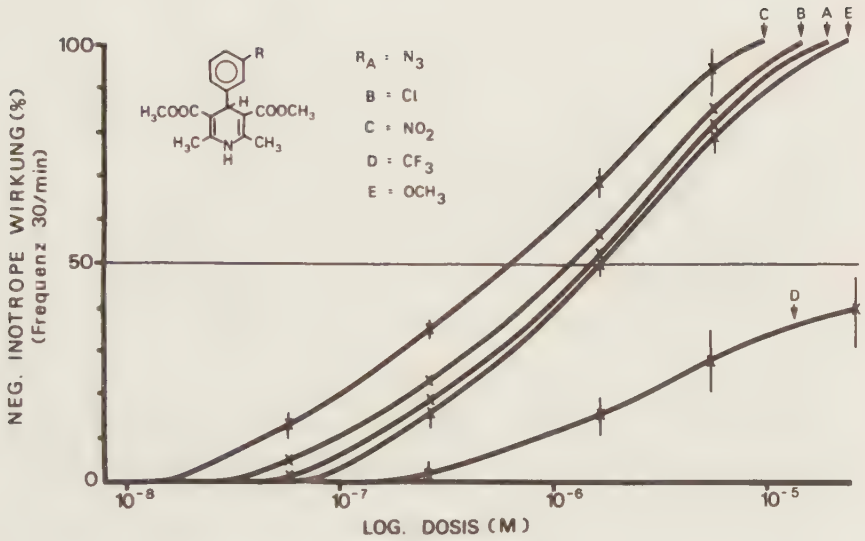


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven von fünf Nifedipineanalogen; der Substitutionsort ist die meta-Position am Aromaten. Beachte den abweichenden Verlauf für die Substanz VS-010 ($R=CF_3$), ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Betrachtet man den Einfluß der 5 Abwandlungsprodukte auf die AFB, so gilt auch für die ortho-substituierten Derivate die folgende Aussage: Die Kontraktionsamplituden werden bei allen Reizfrequenzen gleichmäßig bzw. bei niedrigen Reizfrequenzen etwas stärker gesenkt. Eine Umkehr der AFB (Verapamileffekt) wurde unter keinem Derivat beobachtet.

Die Restitutionskonstanten sind gegenüber den Kontrollwerten verlängert. Sie betragen im Dosisbereich $3x10^{-6}$ bis $3x10^{-5}$ M:

Code-Nr.	VS-008	VS-009	VS-010	VS-011	VS-013
τ (ms)	550	700	800	600	600

Tabelle 6: Restitutionskonstanten von fünf meta-substituierten DHP-Derivaten. Kontrollwert = 400 ms.

Eine Wirkung auf die transitorischen Treppen kann man bei allen Substanzen beobachten, insbesondere in den hohen Dosisbereichen, in denen eine 80-100%ige negativ inotrope Wirkung auftritt. In diesen Bereichen ($3x10^{-6}$ bis $3x10^{-5}$ M) ist das Wiederansteigen der Kontraktionsamplituden bis zu einem neuen steady state (30/min, 60/min) gegenüber der Kontrollsituation verlangsamt.

Das völlig abweichende Verhalten der Substanz VS-010 ($R=CF_3$) ließ zunächst einmal die Vermutung entstehen, daß dieses Derivat eventuell verunreinigt sei bzw. einen oxidierten DHP-Ring besitzen könnte. Die daraufhin vorgenommenen Reinheitsuntersuchungen dieser Substanz (DC, UV) ergaben jedoch für diese Vermutung keinerlei Beweise. So kann eventuell angenommen werden, daß das unterschiedliche Wirkmuster dieser Substanz durch die Substitutionsposition und den ausgeprägten negativ induktiven Effekt der CF_3-Gruppe bedingt ist: Während nämlich die ortho-ständige CF_3-Gruppe (Derivat VS-006) aus sterischen Gründen keine biochemische Reaktion (Bindung) eingehen kann, könnte eine meta-ständige CF_3-Gruppe an einer solchen Reaktion beteiligt sein.

3.2.2.3 Substituentenvariationen in para-Position und mehrfache Ringsubstitution

Inotrope Wirkmusteranalysen mit Substanzen dieser Gruppe erwiesen sich als problematisch: Die Stoffe VS-014 (4-Cl), VS-018 (2-NO_2, 4-Cl), VS-019 (3-NO_2, 4-OCH_3), VS-017 (4-NO_2) fielen im Konzentrationsbereich von ca. > $3x10^{-5}$ M aus. Da die Derivate in diesen Dosen noch nicht ihre Maximalwirkung erreicht hatten, ihre Meßpunkte hohe Streuungen um den Mittelwert zeigten und ihre Dosis-Wirkungskurven einen zum Teil anderen Verlauf nahmen als unter Nifedipine (siehe dazu auch Abb. 17), erschienen diese Testsubstanzen für weitere qualitative und quantitative Struktur-Wirkungsanalysen ungeeignet. Der Stoff VS-021 (3-OH, 4-OCH_3) verdient allerdings besondere Beachtung. Im Dosisbereich $3x10^{-5}$ M bewirkte er eine leichte Zunahme der Kontraktionsamplituden (bis 10%). Eine Aussage darüber, ob bei Dosiserhöhung die positiv inotrope Wirkung weiter zunimmt oder dann eine negativ inotrope Wirkung eintritt, kann leider nicht getroffen werden, da auch dieses Abwandlungsprodukt im Perfusionsmedium ausfiel. Komplette molare ED_{50}-Werte für alle Reizfrequenzen konnten nur für die Testsubstanzen VS-015 (4-CH_3), VS-016 (4-OCH_3) und VS-020 (2-OCH_3, 4-NO_2) erhalten werden:

Code-Nr.	6 / min	12 / min	30 / min	60 / min	N
VS-014	1.3×10^{-5}	1.6×10^{-5}	3.7×10^{-5}	-	6
VS-015	7.0×10^{-6}	1.0×10^{-5}	2.5×10^{-5}	4.3×10^{-5}	6
VS-016	2.4×10^{-5}	2.6×10^{-5}	4.6×10^{-5}	8.5×10^{-5}	7
VS-017	-	-	-	-	6
VS-018	3.4×10^{-6}	3.9×10^{-6}	1.7×10^{-5}	-	6
VS-019	2.4×10^{-5}	2.7×10^{-5}	-	-	6
VS-020	4.3×10^{-6}	5.6×10^{-6}	1.0×10^{-5}	2.4×10^{-5}	7
VS-021	-	-	-	-	7

Tabelle 7: Zusammenstellung der molaren ED_{50}-Werte von para- und mehrfach-substituierten DHP-Analogen (soweit sie nicht vor Erreichen einer 50%igen Wirkung ausfielen).

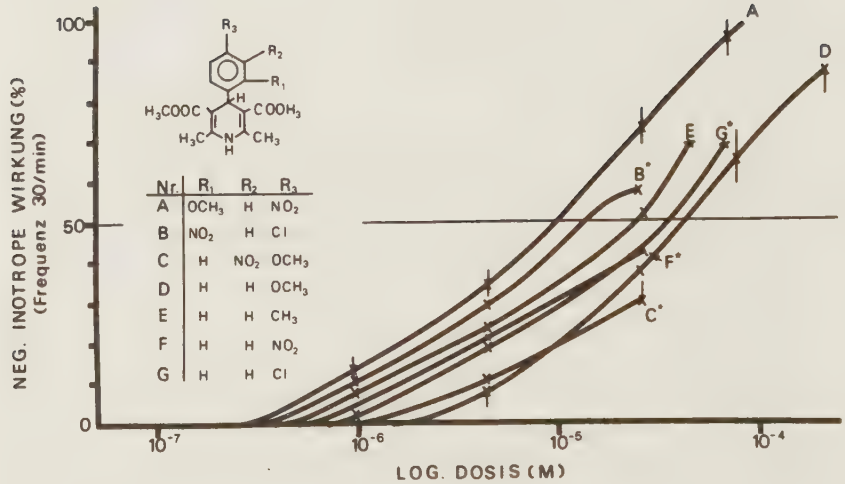


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven von Derivaten, die einen Substituenten am Aromaten in para-Position besitzen. Alle Stoffe, die mit ★ gekennzeichnet sind, fallen im Perfusionsmedium im Dosisbereich $> 3 \times 10^{-5}$ M aus. Da einige Stoffe zudem einen unterschiedlichen Verlauf in ihren Dosis-Wirkungsbeziehungen aufweisen, reduziert sich die Anzahl der para-substituierten DHP-Verbindungen für die QSWA auf drei Stoffe ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

Vergleicht man die molaren ED_{50}-Werte der Strukturisomeren VS-015 (4-CH_3) und VS-002 (2-CH_3) bzw. VS-003 (2-OCH_3) mit VS-008 (3-OCH_3) und VS-016 (4-OCH_3), so zeigt sich klar, daß die Wirksamkeit der Derivate in der Reihenfolge des Substitutionsortes am Aromaten sinkt: ortho > meta > para. Sämtliche para-substituierten Verbindungen wiesen nur in sehr hohen Dosisbereichen ($>1x10^{-5}$ M) registrierbare Beeinflussungen der transitorischen Treppen und der Restitutionskonstanten auf. Die physiologisch vorhandene AFB wurde von Verbindungen dieser Gruppe betont (Versteilerung der AFB, d.h. daß die Kontraktionsamplituden der niederen Reizfrequenzen stärker reduziert werden als die Kontraktionsamplituden der höheren Reizfrequenzen (siehe Abb. 18, 19A). Eine derartige Beeinflussung der AFB ist bei den para-substituierten Abwandlungsprodukten stärker ausgeprägt als bei den meta- oder ortho-substituierten Verbindungen. Eine Umkehr der AFB konnte wiederum unter keiner Testverbindung beobachtet werden.

Die Ergebnisse der qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse mit aryl-substituierten Derivaten können wie folgt zusammengefaßt werden:

1) Die Wirksamkeit der Derivate sinkt mit der Reihenfolge des Substitutionsortes am Aromaten: ortho > meta > para.
2) Ortho-, meta- und para-substituierte Derivate senken die Kontraktionsamplituden frequenzunspezifisch; einige Derivate reduzieren die Kontraktionsamplituden der niedrigen Reizfrequenzen stärker als die der hohen Reizfrequenzen; kein Derivat kehrt die AFB um.
3) Die Restitutionskonstante und die transitorischen Treppen werden von allen ortho- und meta-substituierten Derivaten stärker betroffen als von para-substituierten Abwandlungsprodukten.
4) Nicht alle untersuchten DHP-Derivate weisen einen gleichen Dosis-Wirkungskurvenverlauf und damit eine vergleichbare intrinsic activity auf.

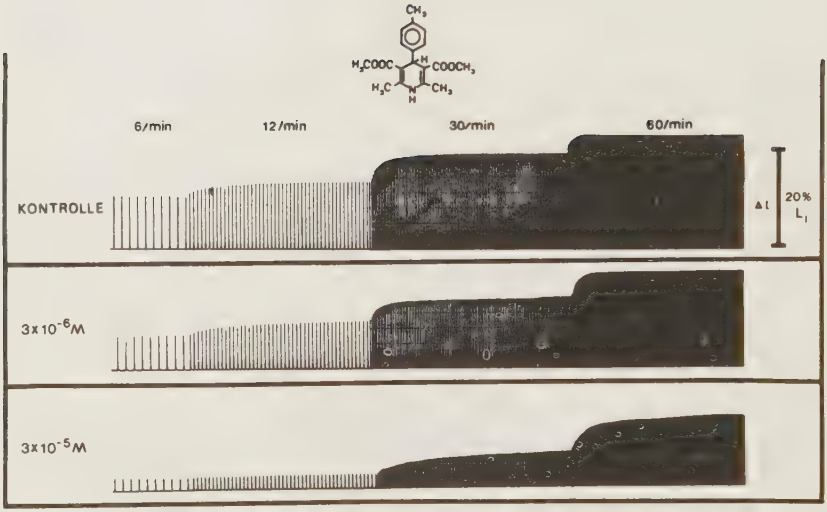


Abb. 18: Originalregistrierungen isotoner Kontraktionen eines Katzenpapillarmuskels unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe des DHP-Derivats VS-015 (R=4-CH_3). Wie von allen DHP-Derivaten, die in para-Position am Aromaten substituiert sind, werden die dynamischen Übergänge nach Frequenzsteigerung in Dosisbereichen $< 3x10^{-5}$ M nicht betroffen und die Kontraktionsamplituden der niedrigen Reizfrequenzen (6, 12/min) stärker gesenkt als die Kontraktionsamplituden der höheren Reizfrequenzen (30, 60/min).

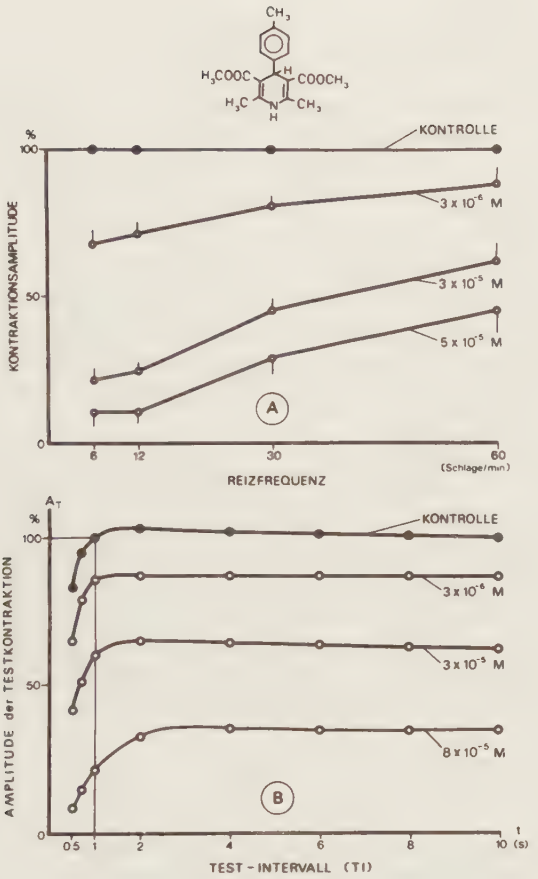


Abb. 19: Bildteil A: Graphische Darstellung der Amplituden-Frequenzbeziehung unter dem Einfluß der Substanz VS-015 (R=4-CH_3). Bei dieser Darstellung wird deutlich, daß die Kontraktionsamplituden bei niedrigen Reizfrequenzen mehr gesenkt werden als bei hohen Reizfrequenzen.
Bildteil B: Der Restitutionsvorgang ist von dieser - wie von allen para-substituierten Substanzen - kaum betroffen. Die Restitutionskinetik wurde nach der im Kapitel 3.1.3 beschriebenen Methode bestimmt.

3.2.3 Variationen der Estergruppierung

Wie aus dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurve hervorgeht (Abb. 14), besitzt die Substanz VS-400 die gleiche intrinsic activity, aber eine verminderte Affinität zu den Wirkrezeptoren wie Nifedipine. Da sich eine strukturelle Veränderung bei der Substanz VS-400 auf ihre Estergruppierung bezieht (Diäthyl- statt Dimethylester), erscheinen weitere Versuche mit Ester-abgewandelten DHP-Verbindungen sinnvoll. In der Abb. 20 sind die parallel verlaufenden Wirkungskurven mit fünf entsprechenden analogen Abwandlungsprodukten dargestellt. Die molaren ED_{50}-Werte für alle Reizfrequenzen lauten:

Code-Nr.	6 / min	12 / min	30 / min	60 / min	N
VS-009	4.9×10^{-7}	4.6×10^{-7}	5.8×10^{-7}	1.3×10^{-6}	8
VS-022	4.1×10^{-6}	3.5×10^{-6}	2.0×10^{-6}	2.6×10^{-6}	6
VS-023	4.7×10^{-7}	5.0×10^{-7}	7.5×10^{-7}	1.3×10^{-6}	7
VS-024	5.6×10^{-7}	6.7×10^{-7}	1.4×10^{-6}	1.7×10^{-6}	7
VS-025	9.5×10^{-7}	1.1×10^{-6}	1.3×10^{-6}	3.3×10^{-6}	7

Tabelle 8: Molare ED_{50}-Werte von DHP-Analogen mit abgewandelter Estergruppierung.

Wie aus Abb. 21 hervorgeht, senkt die Substanz VS-024 die Kontraktionsamplituden weitgehend unabhängig von der Reizfrequenz und verlängert die Restitutionskonstante von 400 ms unter Kontrollbedingungen auf ca. 650 ms (Bildteil B, 3×10^{-6} M). Die transitorischen Treppen werden lediglich in geringem Maße beeinflußt (negative Treppe und verlangsamtes Wiederansteigen der Kontraktionsamplituden nach Frequenzwechsel zu einem neuen steady state). Ein qualitativ gleiches Wirkmuster weisen alle übrigen Substanzen dieser Verbindungsreihe auf. In dieser analogen Stoffgruppe finden sich demzufolge recht einheitlich wirkende DHP-Verbindungen.

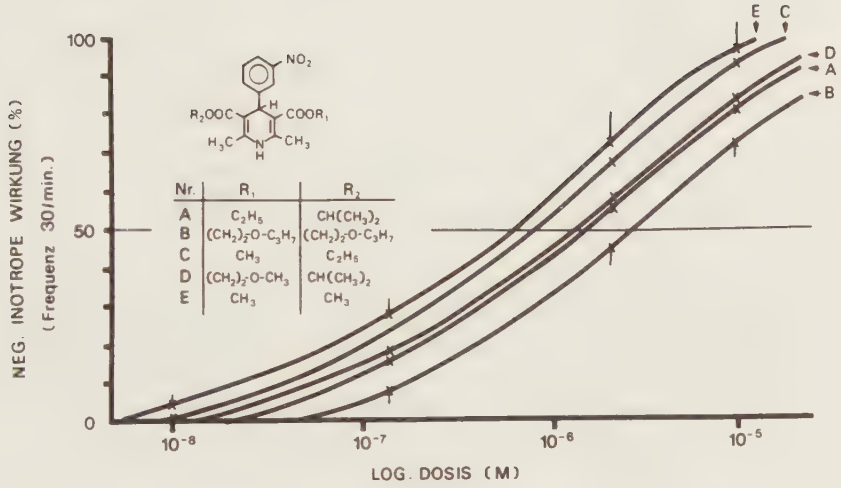


Abb. 20: Dosis-Wirkungskurven für alle DHP-Derivate mit abgewandelter Esterstruktur. Unter dem Einfluß dieser Stoffe ergeben sich parallel verlaufende Kurven, die ein Ausdruck der identischen intrinsic activity sind ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$).

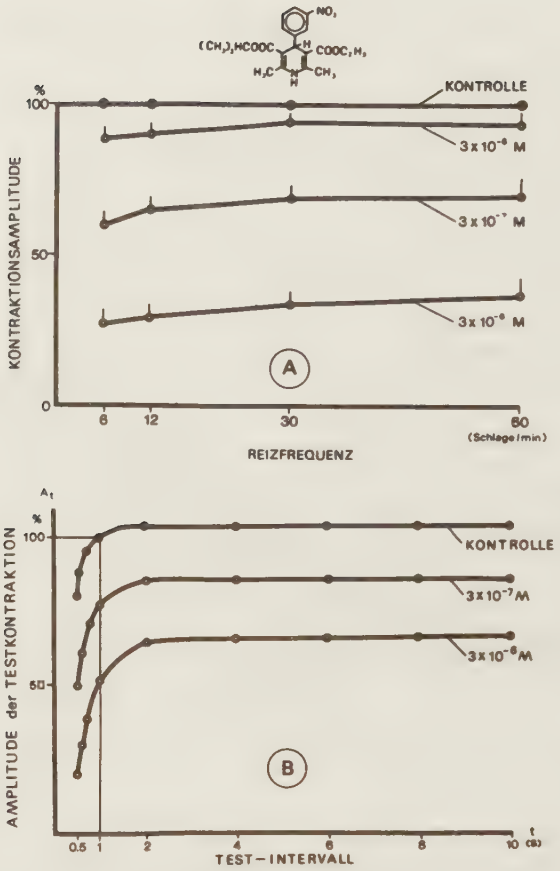
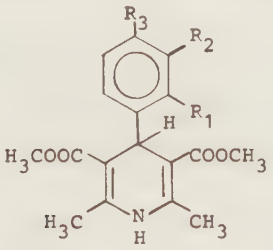


Abb. 21: Stellvertretend für sämtliche Stoffe aus der Gruppe der DHP-Derivate mit abgewandelter Esterstruktur sind die Wirkungen der Substanz VS-024 auf die AFB, Bildteil A, und die Restitution, Bildteil B, dargestellt. Während die AFB nahezu frequenzunspezifisch beeinflußt wird, wird die Restitutionskonstante verlängert.

Für das typische (Nifedipine-ähnliche) kontraktile Wirkmuster ist es nach diesen Ergebnissen unwichtig, ob symmetrische oder unsymmetrische Estergruppen vorliegen. Die Wirkungsstärke dagegen scheint in einer direkten Beziehung zur Größe der Estergruppen zu stehen. Eine Bestätigung dieser Überlegung bzw. eine Aufklärung von weiteren Zusammenhängen zwischen chemischen Substituenteneigenschaften und biologischer Wirkung wird weiter unten (Kapitel 3.4) im Rahmen der QSWA gegeben.

3.3 DIE LIPOPHILIEKONSTANTEN DER VERSUCHSSUBSTANZEN

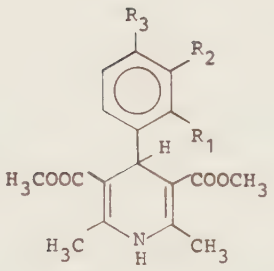
Das lipophile Verteilungsmuster aller getesteten Abwandlungsprodukte und des Hauptmetaboliten wurde nach der im Kapitel 2.5 ausführlich beschriebenen Methode der Phasenumkehr dünnschichtchromatographisch bestimmt. Als Mittelwerte aus mindestens drei Einzelbestimmungen sind in den folgenden Tabellen die erhaltenen R_F- und R_M-Werte aufgeführt:



R_1	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
NO_2	VS - 001	0.19	0.63
CH_3	VS - 002	0.86	0.86
OCH_3	VS - 003	0.38	0.21
SCH_3	VS - 004	0.13	0.83
CN	VS - 005	0.38	0.21

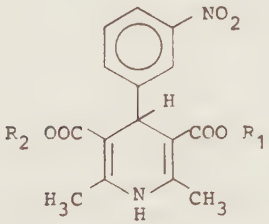
R_1	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
CF_3	VS - 006	0.07	1.12
Cl	VS - 007	0.10	0.95
H	VS - 012	0.22	0.54
R_2			
OCH_3	VS - 008	0.32	0.33
NO_2	VS - 009	0.16	0.72
CF_3	VS - 010	0.07	1.12
Cl	VS - 011	0.10	0.95
N_3	VS - 013	0.11	0.91
R_3			
Cl	VS - 014	0.10	0.95
CH_3	VS - 015	0.17	0.69
OCH_3	VS - 016	0.29	0.39
NO_2	VS - 017	0.15	0.75

Tabelle 9: Ergebnisse der verteilungschromatographischen Bestimmungen der Lipophiliekonstanten von arylsubstituierten DHP-Derivaten (ortho- bzw. meta- bzw. para-substituiert). Kleine R_F-und große R_M-Werte bedeuten hohe Fettlöslichkeit.



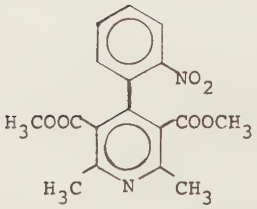
R_1	R_2	R_3	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
NO_2	H	Cl	VS - 018	0.10	0.95
H	NO_2	OCH_3	VS - 019	0.12	0.87
OCH_3	H	NO_2	VS - 020	0.21	0.58
H	OH	OCH_3	VS - 021	0.49	0.02

Tabelle 10: Lipophiliekonstanten von mehrfach arylsubstituierten DHP-Derivaten

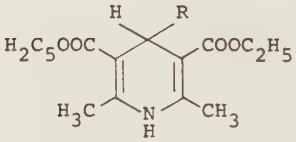


R_1	P_2	Code-Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
$(CH_2)_2$-O-C_3H_7	$(CH_2)_2$-O-C_3H_7	VS-022	0.03	1.51
CH_3	C_2H_5	VS-023	0.12	0.87
C_2H_5	$CH(CH_3)_2$	VS-024	0.05	1.28
$(CH_2)_2$-O-CH_3	$CH(CH_3)_2$	VS-025	0.09	1.01
CH_3	CH_3	VS-009	0.16	0.72

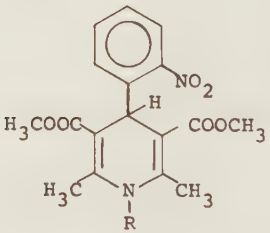
Tabelle 11: Lipophiliekonstanten der DHP-Derivate mit abgewandelter Esterstruktur. Die Substanz VS-022 besitzt die höchste Fettlöslichkeit aller untersuchten Derivate.



R	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
-	VS - 300	0.35	0.27

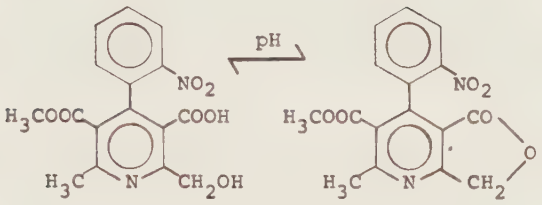


R	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
CH_3	VS - 400	0.24	0.50



R	Code - Nr.	R_F- Wert	R_M- Wert
CH_3	VS - 200	0.16	0.72

Metaboliten von VS-001 - Code-Nr. VS-100



R_F = 0.89 R_M = -0.91

R_F = 0.52 R_M = -0.03

Durch den Vergleich der R_M-Werte mit den negativ inotropen Wirkungen der entsprechenden Stoffe lassen sich folgende qualitative Aussagen treffen: Ein direkter Zusammenhang zwischen der Lipophilie (hoher R_M-Wert = hohe Lipophilie) und der biologischen Wirkung ist für die 21 getesteten Derivate mit Substitutionsort am Aromaten nicht erkennbar. Diese Tatsache wird besonders deutlich durch Vergleiche zwischen Strukturisomeren, die bei zum Teil identischen R_M-Werten eine überaus unterschiedliche negativ inotrope Wirkung besitzen (z.B. VS-007 und VS-014, VS-003 und VS-015).

Dagegen wird ein Zusammenhang zwischen der Lipophilie der Substanzen mit ortho- oder meta-substituiertem Aromaten auf die Restitutionskonstante deutlich: Derivate mit hohen R_M-Werten wie z.B. VS-006 (2-CF_3) und VS-010 (3-CF_3) verlängern die Restitutionskonstante wesentlich mehr (1150 und 800 ms) als Stoffe mit niedrigen R_M-Werten wie z.B. VS-003 (2-OCH_3) oder VS-008 (3-OCH_3)(650 und 550 ms). Da intrazelluläre Angriffspunkte bei einer Beeinträchtigung des Restitutionsprozesses im Rahmen der EMK angenommen werden müssen (siehe Kapitel 3.1.3), wäre dieser Zusammenhang sehr gut erklärbar: Lipophile Derivate können (lipophile) Zellstrukturen schneller passieren um zu intrazellulären Angriffspunkten zu gelangen

als lipophobe Derivate. Wegen ihrer besseren Fettlöslichkeit wäre auch eine stärkere Bindung an Wirkrezeptoren möglich. Für die Gruppe der 5 Derivate mit unterschiedlichen Esterstrukturen ist eine eindeutige Abhängigkeit zwischen sinkender Fettlöslichkeit und Zunahme der negativ inotropen Wirkung feststellbar.

Abschließend soll auf die wesentlich geringeren R_M-Werte der Metaboliten von Nifedipine (-0.91 und -0.03) im Vergleich zur Ausgangssubstanz (0.63) hingewiesen werden. Diese Versuchsresultate stimmen sehr gut mit den dünnschichtchromatographischen Ergebnissen von MEDENWALD, SCHLOSSMANN und WÜNSCHE (1972) überein.

3.4 DIE ERGEBNISSE DER HANSCH-ANALYSE

3.4.1 Einzelkorrelationen mit DHP-Derivaten, deren Estergruppierungen variieren

Der im Kapitel 3.3 beschriebene Zusammenhang zwischen biologischer Wirkung (ED_{50}) und physikochemischem Parameter (R_M) dieser Derivategruppe soll mit den Methoden der QSWA nicht nur bestätigt, sondern auch mathematisch-statistisch exakt erfaßt werden. In Einzelkorrelationen kann weiterhin geprüft werden, ob auch elektronische und/oder sterische Substituenteneinflüsse die Wirkung der Derivate mitbestimmen. Die Voraussetzungen für eine multiple lineare Regression sind wegen der zu geringen Zahl untersuchter analoger Verbindungen dieser Gruppe nicht gegeben (TOPLISS und COSTELLO, 1972). Eine Zusammenfassung aller verwendeten Werte enthält die folgende Tabelle:

Code-Nr.	$\log\frac{1}{C}$	R_M	π	π^2	$\sigma^\star$	E_s	V_w
VS-022	5.69	1.51	3.06	9.36	-0.08	-1.44	116.56
VS-024	5.86	1.28	2.37	5.62	-0.29	-0.54	58.02
VS-023	6.12	0.87	1.52	2.31	-0.10	-0.07	37.57
VS-025	5.89	1.01	1.90	3.61	0.07	-1.24	71.95
VS-009	6.24	0.72	1.04	1.08	0	0	27.34

Tabelle 12: Zusammenstellung sämtlicher Daten für 6 Einzelkorrelationen. Die numerischen Werte für die physikochemischen Parameter wurden entweder selbst erarbeitet (R_M) oder der Literatur (siehe Kapitel 2.4.2) entnommen.

Die Korrelationsergebnisse der sechs möglichen einfachen linearen Regressionen lauten für die Parameter der Lipophilie R_M, π , π^2 sowie für die elektronische ($\sigma^\star$) und sterische Einflüsse (E_s und V_w):

P	r	Regression	B	F	p<
R_M	0.955	$6.670(\pm0.107) - 0.658(\pm0.377)R_M$	0.912	30.935	0.01
π	0.972	$6.501(\pm0.086) - 0.273(\pm0.123)\pi$	0.944	50.185	0.001
π^2	0.940	$6.239(\pm0.123) - 0.063(\pm0.043)\pi^2$	0.883	22.576	0.01
$\sigma^\star$	0.250	$5.992(\pm0.348) + 0.405(\pm2.875)\sigma^\star$	0.062	0.201	n.s.
E_s	0.897	$6.156(\pm0.159) + 0.297(\pm0.270)E_s$	0.804	12.3	0.05
V_w	0.935	$6.325(\pm0.127) - 0.006(\pm0.004)V_w$	0.875	20.978	0.01

Tabelle 13: Ergebnisse von sechs Einzelkorrelationen; r = Korrelationskoeffizient, P = Parameter, B = Bestimmtheitsmaß, F = Wert der Fischer-Verteilung, p = Signifikanz der Korrelation, n.s. = nicht signifikant.

Wie diese Ergebnisse ausweisen, finden sich fünf statistisch signifikante Korrelationen zwischen den biologischen Daten und den lipophilen bzw. den sterischen Substituenteneinflüssen. Die einzige nicht signifikante Korrelation wird mit den numerischen Beträgen für die elektronischen Substituenteneinflüsse erzielt. Somit sind die elektronischen Eigenschaften der Substituenten dieser DHP-Derivate bedeutungslos für die biologische Wirkung. Eine entscheidende Funktion dagegen üben die lipophilen und/oder sterischen Einflüsse dieser Substituenten auf die Wirkung aus. Ob dabei der sterische oder der lipophile Beitrag die größere Bedeutung besitzt, kann im Rahmen einer Hansch-Analyse erst durch die Einbringung weiterer Testsubstanzen aus dieser analogen Verbindungsreihe geklärt werden. Korreliert man nämlich die jeweiligen fünf numerischen Beträge etwa für die Parameter der Lipophilie R_M oder π mit den Parametern des van der Waals Volumens V_w, so ergeben sich signifikante Interkorrelationen. Diese Interkorrelationen können erst durch die Wahl anderer oder zusätzlicher Substituenten vermieden werden.

Eine durchaus erwünschte und zwar höchst signifikante Interkorrelation besteht zwischen den experimentell bestimmten R_M-Werten und den in der Literatur angegebenen π-Werten: Interkorrelationskoeffizient = 0.994, Signifikanz $p < 0.001$. Damit ist das experimentelle dünnschichtchromatographische Verfahren zur Bestimmung eines lipophilen Verteilungsmusters für die getesteten DHP-Derivate eindeutig bestätigt worden und die Gleichwertigkeit von R_M- und π-Werten bewiesen. Sämtliche Interkorrelationsergebnisse, die durch einfache Regressionen zwischen allen fünf verwendeten Parametern erhalten werden, finden sich in der folgenden Tabelle:

	π	π^2	$\sigma^\star$	E_S	V_W
R_M	0.995	0.987	0.448	0.754	0.891
	0.001	0.01	n.s.	n.s.	0.05
π		0.989	0.379	0.799	0.923
		0.01	n.s.	n.s.	0.05
π^2			0.340	0.781	0.935
			n.s.	n.s.	0.05
$\sigma^\star$				0.199	0.002
				n.s.	n.s.
E_S					0.933
					0.05

Tabelle 14: Interkorrelationen zwischen fünf Parametern. Jedes Wertepaar setzt sich aus dem Interkorrelationskoeffizienten (r_I = oberer Wert) und der Signifikanzangabe ($p <=$ unterer Wert) zusammen. n.s. = nicht signifikant.

3.4.2 Regressionsanalysen mit DHP-Derivaten, deren Substituenten am Aromaten variieren

Die Dosis-Wirkungskurven weisen nicht für alle Abwandlungsprodukte dieser Gruppe einen gleichen Verlauf auf. Ebenso lassen sich für einige Stoffe keine vergleichbaren ED_{50}-Werte aufstellen (siehe Kapitel 3.2.2.3). Deswegen wurde eine QSWA nicht mit allen getesteten Stoffen dieser analogen Reihe durchgeführt. Die Unterteilung der Derivate je nach Substituentenposition (ortho, meta, para) wurde zunächst auch bei der QSWA beibehalten, da zum Teil unterschiedliche Beeinflussungen der Restitutionskinetik und der AFB in Abhängigkeit vom Substitutionsort ermittelt wurden. Eine Zusammenstellung aller Stoffe und korrelierten Daten beinhaltet die folgende Tabelle:

Code-Nr.	$R_{2,3,4}$	$\log\frac{1}{C}$	R_M	ΔR_M	ΔR_M^2	π	π^2	σ	F	R	μ	μ^2	MV	V_w	r_w	E_s
VS-001	2-NO_2	6.43	0.63	0.09	0.01	-	-	1.24	-	-	3.98	15.84	24.51	16.8	1.77	0.23
VS-005	2-CN	6.37	0.21	-0.33	0.11	-0.33	0.11	-	1.06	0.16	4.0	16.0	22.67	14.7	1.78	-
VS-003	2-OCH_3	5.96	0.21	-0.33	0.11	-0.33	0.11	0	0.52	-0.43	1.25	1.56	38.5	8.04 (OH)	1.52	0.69
VS-004	2-SCH_3	6.46	0.83	0.29	0.08	0.87	0.76	-	0.41	-0.16	1.27	1.62	42.26	14.81 (SH)	1.9	-
VS-002	2-CH_3	6.42	0.86	0.32	0.1	0.84	0.71	-0.13	-0.07	-0.12	0.4	0.16	31.48	13.67	2.0	0
VS-007	2-Cl	6.35	0.95	0.41	0.17	0.76	0.58	0.68	0.86	-0.14	1.58	2.5	22.96	12.0	1.77	0.27
VS-006	2-CF_3	6.72	1.12	0.58	0.34	1.04	1.08	-	0.79	0.16	2.56	6.55	32.11	21.33	2.5	-1.16
VS-012	H	5.92	0.54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.9	3.45	1.2	1.24
VS-011	3-Cl	5.91	0.95	0.41	0.17	0.77	0.59	0.37	0.68	-0.06	1.58	2.5	22.96	12.0	1.77	0.27
VS-008	3-OCH_3	5.8	0.33	-0.21	0.04	0.12	0.01	0.12	0.41	-0.17	1.25	1.56	38.5	8.04	1.52	0.69
VS-009	3-NO_2	6.24	0.72	0.18	0.03	0.11	0.01	0.71	1.09	0.05	3.98	15.84	24.51	16.8	1.77	0.23
VS-013	3-N_3	5.85	0.91	0.37	0.14	0.46	0.21	0.27	-	-	1.55	2.4	-	-	-	-
VS-016	4-OCH_3	4.34	0.39	-0.15	0.02	-0.03	0.001	-0.27	0.41	-0.5	1.25	1.56	38.5	8.04	1.52	-
VS-015	4-CH_3	4.6	0.69	0.15	0.02	0.6	0.36	-0.17	-0.05	-0.14	0.4	0.16	31.48	13.67	2.0	-
VS-020	2-OCH_3 4-NO_2	5.0	0.58	0.04	0.002	-0.11	0.01	1.24	1.63	-0.27	-	-	63.01	24.84	-	0.69 (2-OCH_3)

Tabelle 15: Zusammenstellung aller biologischen Testdaten (log 1/C) sowie sämtlicher physikochemischer Substituentenwerte, die im Rahmen der Hansch-Analyse mit arylsubstituierten Derivaten verwendet wurden.
R_2 = ortho-, R_3 = meta-, R_4 = para-Arylsubstituent.

3.4.2.1 Korrelationen mit ortho-substituierten Verbindungen

Wie aus Tabelle 15 hervorgeht, sind die Literaturwerte für die ortho-substituierten Verbindungen unvollständig. Aus diesem Grunde schwankt die Anzahl der Derivate der einzelnen Regressionsanalysen. Die Ergebnisse der Einzelkorrelationen lauten, soweit sie statistisch signifikante Resultate erbrachten:

N	P	r	Regression	B	F	p<
6	E_S	0.935	$6.376(\pm 0.138) - 0.375(\pm 0.189)E_S$	0.874	27.72	0.01
8	r_w	0.933	$5.133(\pm 0.089) + 0.622(\pm 0.256)r_w$	0.87	40.22	0.001
8	V_w	0.961	$5.714(\pm 0.069) + 0.047(\pm 0.014)V_w$	0.924	72.68	0.001
8	R_M	0.707	$5.780(\pm 0.235) + 0.752(\pm 0.751)R_M$	0.5	6.01	0.05

Tabelle 16: Zusammenfassung aller statistisch signifikanten Korrelationen mit ortho-substituierten Derivaten. N = Anzahl der Derivate.

Verbesserte Korrelationskoeffizienten kann man durch multiple Regressionen erzielen. Korreliert man von 8 Verbindungen die biologischen Daten mit den numerischen Beträgen für sterische (V_w) und lipophile Substituenteneinflüsse (R_M), so erhält man beispielsweise das folgende Ergebnis:

r	Regression	B	F	p<
0.985	$5.662(\pm 0.049) + 0.041(\pm 0.011)V_w + 0.199(\pm 0.181)R_M$	0.971	82.69	0.001

Diese Regression lautet in ihrer normierten Form:

$$0.833(\pm 0.229)V_w + 0.252(\pm 0.229)R_M = \log \frac{1}{ED_{50}} \text{ norm.}$$

Damit wird in direkter Weise zum Ausdruck gebracht, daß der Einfluß des van der Waals Volumen der Substituenten für die biologische Wirkung dieser DHP-Abwandlungsprodukte von weitaus größerer Bedeutung ist als ihre Lipophilie.

Wie aus der Tabelle (siehe unten) hervorgeht, können die beiden Parameter R_M und V_w zusammen in einer multiplen Regressionsanalyse verwendet werden, da zwischen ihnen keine signifikante Abhängigkeit besteht:

	ΔR_M	ΔR_M^2	π	π^2	μ	μ^2	MV	V_w	r_w
R_M	1 0.001	0.53 -	0.92 0.01	0.84 0.01	0.19 -	0.3 -	0.13 -	0.51 -	0.66 -
ΔR_M	1	0.53 -	0.92 0.01	0.84 -	0.19 -	0.3 -	0.13 -	0.51 -	0.66 -
ΔR_M^2		1	0.58 -	0.76 0.05	0.15 -	0.04 -	0.29 -	0.61 -	0.8 0.05
π			1	0.95 0.001	0.36 -	0.48 -	0.34 -	0.44 -	0.67 -
π^2				1	0.16 -	0.32 -	0.5 -	0.63 -	0.85 0.01
μ					1	0.97 0.0001	0.11 -	0.64 -	0.34 -
μ^2						1	0.27 -	0.51 -	0.19 -
MV							1	0.34 -	0.43 -
V_w								1	0.92 0.01

Tabelle 17: Ergebnisse der Interkorrelationen der Parameter, für die vollständige Literaturangaben vorlagen. Das Maß der Signifikanz der Analysen ($p <$) wurde unter jedem Interkorrelationskoeffizientenwert im Falle $p < 0.05$ angegeben.

Mit allen anderen physikochemischen Parametern, die in der Tabelle 15 aufgeführt sind, ergaben einfache Regressionsanalysen keine signifikanten Ergebnisse. Die sterischen Substituenteneinflüsse bestimmen demnach weitgehend die biologische Wirkung. Abwandlungsprodukte mit großvolumigen Substituenten sind somit die wirksamsten Derivate dieser Verbindungsreihe. Im Vergleich zu den sterischen üben lipophile Substituenteneigenschaften einen geringen Einfluß auf die Wirksamkeit des DHP-Moleküls aus; elektronische Einflüsse besitzen keine Bedeutung.

3.4.2.2 Korrelationen mit meta-substituierten Verbindungen

Diese Gruppe von Abwandlungsprodukten umfaßte lediglich fünf Derivate (inkl. der Verbindung VS-012, R=H). Bei dieser Anzahl korrelierbarer Daten dürften die erhaltenen Ergebnisse von geringerer Relevanz sein als sie dies für die Gruppe der ortho-substituierten Derivate sind. So ergaben die einfachen Regressionsanalysen mit vierzehn Parametern (siehe Tabelle unten) nur eine signifikante Korrelation:

P	r	Regression	B	F	p<
μ^2	0.935	$5.832\,(\pm 0.10) + 0.025\,(\pm 0.017)\,\mu^2$	0.874	20.891	0.01

Bei dieser Stoffgruppe ist lediglich μ^2, ein Parameter für elektronische Substituenteneigenschaften, mit der negativ inotropen Wirkung korrelierbar.

Definitionsgemäß erfaßt der Term μ^2 Dipol-induzierte Dipolinteraktionen zwischen den Substituenten eines Pharmakons

und seinem Rezeptor (McFARLAND, 1971). Die Hammett-Konstante, mit der annähernd signifikante Korrelationsergebnisse erzielt wurden, beschreibt Ionen-Dipol, Ionen-Ionen-Wechselwirkungen und Rezeptorinteraktionen über Wasserstoffbrücken (TUTE, 1971). Durch die sterischen Molekülbedingungen ist eindeutig zu belegen, daß solche Interaktionen bei meta-substituierten DHP-Derivaten eher möglich sind als bei ortho-substituierten Verbindungen. In diesem Zusammenhang sei an den abweichenden Verlauf der Dosis-Wirkungskurve des Stoffes VS-010 (3-CF_3) erinnert. Als Erklärung für das völlig andere Wirkbild dieser Substanz wurde ein sterisch begünstigtes Bindungsverhalten der CF_3-Gruppe angeführt (Kapitel 3.2.2.2). Die Ergebnisse der QSWA unterstützen diese Vermutung.

3.4.3.3 Korrelationen mit ortho- und meta-substituierten Derivaten

Führt man einfache Regressionsanalysen mit den entsprechenden log $^1/_C$-Daten und allen Parametern, die in Tabelle 15 aufgeführt sind, durch, so erhält man signifikante Korrelationen mit den Parametern der sterischen Substituenteneinflüsse. Diese einfachen Korrelationen können - erweitert um den elektronischen Parameter μ^2 - nicht verbessert werden, während multiple Regressionen mit Parametern für sterische und lipophile Einflüsse geringfügige Verbesserung der Korrelationskoeffizienten erbringen (siehe Tabelle 19).

In diesen normierten Regressionen wird durch den direkten Vergleich der Parametereinflüsse in einer Gleichung die wesentlich größere Bedeutung des sterischen Einflusses gegenüber lipophilen oder elektronischen Effekten deutlich. Interkorrelationsanalysen der Parameterbeträge von ortho- und meta-ständigen Substituenten wurden für R_M, ΔR_M, $\Delta R_M{}^2$, π, π^2, F, R, μ, μ^2, MV, V_w und r_w durchgeführt. Diese Berech-

N	P	r	Regression	B	F	p<
9	E_S	0.832	$6.303(\pm0.146) - 0.397(\pm0.236)E_S$	0.692	15.746	0.01
11	V_W	0.844	$5.593(\pm0.113) + 0.050(\pm0.024)V_W$	0.712	22.301	0.001
11	r_W	0.825	$4.914(\pm0.120) + 0.745(\pm0.385)r_W$	0.68	19.124	0.001
11	V_W ΔR_M^2	0.846	$5.600(\pm0.122) + 0.048(\pm0.030)V_W$ $+ 0.199(\pm1.522)\Delta R_M^2$	0.716	10.07	0.01
11	V_W R_M	0.849	$5.570(\pm0.120) + 0.046(\pm0.030)V_W$ $+ 0.104(\pm0.471)\ R_M$	0.722	10.364	0.01
11	μ^2 V_W	0.809	$5.700(\pm0.134) - 0.005(\pm0.025)\mu^2$ $+ 0.045(\pm0.030)\ V_W$	0.654	7.572	0.01
9	E_S R_M	0.839	$6.176(\pm0.160) - 0.343(\pm0.380)E_S$ $+ 0.159(\pm0.819)\ R_M$	0.703	7.116	0.05

Tabelle 18: Zusammenfassung von signifikanten Korrelationen der ortho- und meta-substituierten Derivate. Die Regressionen der multiplen Analysen sind in der nicht normierten Form dargestellt. Bei multiplen Regressionen ist r = Gesamtkorrelationskoeffizient.

Die multiplen Regressionen lauten in der normierten Form:

P	Regression
V_W, ΔR_M^2	$0.811(\pm0.5)V_W + 0.066(\pm0.5)\Delta R_M^2$
V_W, R_M	$0.786(\pm0.5)V_W + 0.111(\pm0.5)R_M$
μ^2, V_W	$-0.113(\pm0.579)\mu^2 + 0.867(\pm0.579)V_W$
E_S, R_M	$-0.719(\pm0.797)E_S + 0.155(\pm0.797)R_M$

Tabelle 19: Darstellung der signifikanten multiplen Regressionsanalysen in normierter Form. Weitere Erklärungen siehe Kapitel 2.4.1.

nungen ergaben zum einen die erwünschte höchst signifikante Interkorrelation zwischen R_M und π ($r_T = 0.935$, $p < 0.001$) und zum anderen die Unabhängigkeit der kombiniert verwendeten Parameter π^2 und V_w, V_w und R_M, ΔR_M^2 und V_w.

3.4.2.4 Korrelationen mit ortho-, meta und para-substituierten Derivaten

Einfache Regressionsanalysen mit den Daten dieser Gruppe erbrachten die folgenden signifikanten Zusammenhänge:

N	P	r	Regression	B	F	p<
15	ΔR_M^2	0.518	$5.532 (\pm 0.351) + 4.013 (\pm 3.973) \Delta R_M^2$	0.268	4.76	0.05
14	r_w	0.772	$3.276 (\pm 0.283) + 1.562 (\pm 0.808)\ r_w$	0.597	17.747	0.001
14	V_w	0.812	$4.703 (\pm 0.260) + 0.107 (\pm 0.048)\ V_w$	0.659	23.23	0.001
13	R	0.634	$6.151 (\pm 0.369) + 2.393 (\pm 1.937)\ R$	0.402	7.396	0.05

Tabelle 20: Zusammenstellung der signifikanten Korrelationen von ortho-, meta- und para-substituierten Derivaten. Wegen unvollständig vorhandener Parameterwerte schwankt die Anzahl eingesetzter Derivate (N).

Die beiden Korrelationen mit r_w bzw. V_w sind allerdings nur unter der Voraussetzung statistisch signifikant, daß der numerische Betrag des sterischen Einflusses für para-Substituenten vernachlässigt und dafür der numerische Wert des ortho-Substituenten (R=H) eingesetzt worden ist (alleinige Berücksichtigung des sterischen Einflusses des ortho-ständigen Substituenten). Die Ergebnisse von multiplen Regressionen mit dieser Stoffgruppe lauten:

N	P	r	Regression	B	F	p<
14	E_S R_M	0.762	$6.486(\pm0.356) - 0.955(\pm0.777)\ E_S - 0.346(\pm1.906)\ R_M$	0.581	6.24	0.05
12	E_S ΔR_M^2	0.768	$6.445(\pm0.352) - 1.060(\pm0.942)\ E_S - 1.663(\pm6.248)\Delta R_M^2$	0.589	6.46	0.05
13	V_w R	0.819	$4.990(\pm0.290) + 0.090(\pm0.070)\ V_w + 0.792(\pm1.972)\ R$	0.671	10.19	0.01
14	π^2 V_w	0.813	$4.708(\pm0.274) + 0.104(\pm0.060)\ \pi^2 + 0.076(\pm0.920)\ V_w$	0.66	10.70	0.01
15	V_w ΔR_M^2	0.814	$4.716(\pm0.273) + 0.102(\pm0.060)\ V_w + 0.489(\pm3.780)\Delta R_M^2$	0.466	10.77	0.05

Tabelle 21: Signifikante multiple Regressionsanalysen von ortho-, meta- und para-substituierten Derivaten. r = Gesamtkorrelationskoeffizient. N = Anzahl der Derivate.

Diese Regressionen (siehe oben) nehmen in der normierten Form die folgenden Werte an:

P	Regression
E_S, R_M	$-0.844(\pm0.687)\ E_S - 0.125(\pm0.687)\ R_M$
E_S, ΔR_M^2	$-0.938(\pm0.833)\ E_S - 0.222(\pm0.833)\Delta R_M^2$
π^2, V_w	$0.792(\pm0.445)\ \pi^2 + 0.038(\pm0.455)\ V_w$
V_w, ΔR_M^2	$0.775(\pm0.482)\ V_w + 0.062(\pm0.482)\Delta R_M^2$
V_w, R	$0.669(\pm0.520)\ V_w + 0.210(\pm0.520)\ R$

Tabelle 22: Darstellung der Regressionsanalysen der Tabelle 21 in der normierten Form.

Bei den quantitativen Analysen mit dieser umfangreichen Stoffgruppe wird erneut die entscheidende Bedeutung des sterischen Einflusses der Substituenten für die Wirkung deutlich. Desweiteren muß aber erwähnt werden, daß die Ergebnisse der umfassenden Korrelation von ortho-, meta- und para-substituierten Derivaten - zusammengefaßt in einer Gruppe - schlechter sind als die Korrelationen etwa mit nur ortho- oder nur meta-substituierten Derivaten. Auch eine QSWA der kombinierten Gruppen, gebildet aus ortho- und meta-substituierten Verbindungen, ergeben höhere Korrelationskoeffizienten und höhere Bestimmheitsmaße. Die Bedeutung des sterischen Einflusses für die typische Nifedipinewirkung sinkt demnach mit der Reihenfolge des Substitutionsortes am Aromaten : ortho > meta > para.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei der getroffenen Auswahl von Parametern und Abwandlungsprodukten nicht die Vielzahl eingesetzter DHP-Derivate die Güte der Korrelationen bestimmt, sondern die gezielte gruppenweise Einteilung der Abwandlungsprodukte.

3.4.3 Die Wirkungsvorhersage, ein Anwendungsbeispiel für die Hansch-Analyse

Unter bestimmten Voraussetzungen erlaubt die Methode der Hansch-Analyse die Wirkung von Derivaten einer analogen Substanzreihe vorherzusagen. An einem Beispiel, und zwar für die Substanz VS-012 (R=H), soll dieser Einsatz der QSWA demonstriert werden.

Korreliert man die biologischen Daten von sieben ortho-substituierten DHP-Verbindungen mit dem jeweiligen van der Waals Volumen der Substituenten, so erhält man die folgende Beziehung ($p < 0.001$, $r = 0.944$):

$$\log \frac{1}{ED_{50}} = 5.637(\pm 0.079) + 0.0518(\pm 0.0208)\ V_w$$

Da das van der Waals Volumen des Substituenten R=H (Derivat VS-012) 3.45 beträgt, errechnet sich der unbekannte log $1/ED_{50}$-Wert durch Einsetzen dieses Substituentenvolumens in die obere Gleichung:

$$\log \frac{1}{ED_{50}} = 5.637(\pm 0.079) + [0.0518(\pm 0.0208)]\ 3.45$$
$$= 5.82$$

entspricht 1.5×10^{-6} M

Als ED_{50}-Wert für die Substanz VS-012 wurde experimentell 1.2×10^{-6} M ermittelt.
Mit diesem Beispiel ist die Hansch-Methode zur Vorhersage biologischer Wirkungen (noch) nicht getesteter Verbindungen eindeutig belegt.

4. D I S K U S S I O N

4.1 DIE BEEINFLUSSUNG KONTRAKTILER PHÄNOMENE DURCH NIFEDIPINE

Die ständig zunehmende Zahl von Ca-antagonistischen Medikamenten mit antianginöser Wirkung warf die Frage auf, ob es sich hierbei tatsächlich um Substanzen mit ein und demselben pharmakodynamischen Wirkmechanismus handelt. Betrachtet man diese Stoffgruppe genauer, so fällt auf, daß Ca-Antagonisten überaus strukturunterschiedliche Verbindungen mit differenzierten physikochemischen Eigenschaften sind (siehe Abb. 1), die ebenso unterschiedliche inotrope und elektrophysiologische Herzwirkungen entfalten (BAYER, RODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976). Darüberhinaus umfaßt die elektromechanische Koppelung des Herzens bekanntlich eine Vielzahl transmembranärer und subzellulärer Ca^{2+}-Bewegungen (siehe Kapitel 1.1), in die Ca-Antagonsiten über verschiedene Angriffspunkte eingreifen können. Aus diesen Gegebenheiten kann eindeutig gefolgert werden, daß ein gemeinsamer molekularer Wirkmechanismus im Sinne der Definition von FLECKENSTEIN (FLECKENSTEIN, 1964; FLECKENSTEIN, KAMMERMEIER, DÖRING und FREUND, 1967) für diese Stoffgruppe kaum wahrscheinlich ist.

In dieser Situation schafft eine umfassende Analyse der kontraktilen Wirkmuster von Ca-Antagonisten die Voraussetzung, stoffspezifische, differenzierte Wirkphänomene aufzudecken sowie nähere Hinweise auf den oder die zellulären Angriffspunkt(e) zu erhalten. Nach einer solchen Analyse können dann die Pharmaka dieser Gruppe genauer, d.h. entsprechend ihren Wirkmechanismen klassifiziert werden.

Bisher sind lediglich die Ca-Antagonisten Verapamil, D 600 (BAYER, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975b) und PRENYLAMIN (BAYER, RODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976 einer systematischen Analyse ihrer inotropen Wirkmuster unterzogen worden. Da im Falle von Nifedipine eine solche Untersuchung noch nicht vorgenommen worden ist, sollte mit der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur speziellen Wirkmusteranalyse dieser Substanz geliefert werden.

Nifedipine wirkt bei allen gewählten Reizfrequenzen (6-60/min) gleichstark negativ inotrop. Die ED_{50}-Werte für die negativ inotrope Wirkung betrugen zwischen 6.1×10^{-7} M (6/min) und 5.1×10^{-7} M (60/min). Diese Werte stimmen weitgehend mit denen von VATER, KRONEBERG, HOFFMEISTER, KALLER, MENG, OBERDORF, PULS, SCHLOSSMANN und STOEPEL (1972), FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON (1972), STRAUER (1974), BAUMANN (1976) und REFSUM und LANDMARK (1975) überein. Auch die von STRAUER (1974) beobachtete geringe positiv inotrope Wirkung in niedrigen Dosisbereichen konnte bestätigt werden (Kapitel 3.1.4).

Die Aussage von FLECKENSTEIN (1972), daß Nifedipine etwa 10mal stärker negativ inotrop wirkt als Verapamil, muß hingegen kritischer betrachtet werden. Sie gilt wegen der frequenzspezifischen Verapamilwirkung (BAYER, HENNEKES, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975a; BAYER, KAUFMANN und MANNHOLD, 1975b) lediglich für einen Vergleich der Kontraktionsamplituden bei der hohen Reizfrequenz 60/min. Bei der niedrigen Reizfrequenz 6/min hingegen ist Nifedipine etwa 30mal wirksamer als Verapamil.

Die unterschiedliche Reizfrequenzabhängigkeit der Wirkungen läßt bereits auf keinen gemeinsamen Wirkmechanismus für die Ca-antagonistischen Substanzen Nifedipine und Verapamil schliessen. Nifedipine beeinflußt jedoch nicht nur die AFB, sondern auch die Amplituden-Pausenbeziehung in anderer Weise als Verapamil. Bei einem Vergleich der Amplituden-Pausenbeziehung fällt auf, daß Verapamil die Zeitkonstante des Resti-

tutionsprozesses auf etwa 4 s verlängert, während eine etwa äquieffektive Dosierung (bezogen auf die Reizfrequenz 60/min) von Nifedipine die Zeitkonstante der Restitutionskinetik vergleichsweise nur wenig (ca. 1 s) verlängert (siehe Abb. 11B, Kontrollwert 0.4 s). Die charakteristische Nifedipinewirkung beruht daher auf einer Senkung der Amplituden der Testkontraktionen, die nach längeren Pausenzeiten (2-10 s) ausgelöst werden (Plateauphase der Amplituden-Pausenbeziehung). Dieser Effekt wird unter dem Einfluß von Verapamil nicht beobachtet.

Da die Kurvenverläufe solcher Amplituden-Pausenbeziehungen in etwa die Wiederverfügbarkeit von intrazellulär gespeichertem Kalzium widerspiegeln (siehe Kapitel 3.1.3), können aus diesen Experimenten die folgenden Aussagen zum Wirkmechanismus von Nifedipine getroffen werden:

1) Im Gegensatz zu Verapamil greift Nifedipine weit weniger effektiv in die Prozesse ein, die nach Ablauf einer Kontraktion zurückgebundenes Ca^{2+} wiederverfügbar machen.
2) Der maximale (d.h. der nach langen Pausen) erreichte Füllungszustand der intrazellulären Ca^{2+}-Speicherkompartimente (sarkoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien) ist unter Nifedipine reduziert. Dies kann auf eine Hemmung des transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstromes zurückgeführt werden.

Die Verarmung der Speicher an Kalzium ist somit das entscheidendere Kriterium für die typische Nifedipinewirkung. Die Verlangsamung der Restitutionsprozesse spielt dagegen als molekularer Wirkmechanismus eine untergeordnete Rolle.

Dieses Resultat scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen von BAUMANN (1976) zu stehen, der an isolierten linken Meerschweinchenvorhöfen eine starke Hemmung des Restitutionsvorganges durch Nifedipine beschreibt. BAUMANN klassifiziert daher Nifedipine als eine "Verapamil-ähnliche" Substanz!

Nun ist es durchaus möglich, daß die abweichenden Versuchsergebnisse von BAUMANN auf Unterschiede in Spezies und/oder Muskelpräparat beruhen. Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß unterschiedliche Versuchsbedingungen diese Diskrepanz verursachen: So stimulierte BAUMANN seine Präparate mit einer Grundreizfrequenz von 240/min. In dieser Situation hat eine Variation von $(Ca^{2+})_o$ keinen wesentlichen Einfluß auf die Kontraktionsamplituden isolierter Vorhöfe (wie BAUMANN selbst zeigt). Es muß daher vermutet werden, daß bei solch frequenter Reizung die erregungsbedingte transmembranäre Ca^{2+}-Versorgung in einem Sättigungsbereich arbeitet, und ein maximaler Füllungszustand der intrazellulären Speicher erreicht ist (BAYER, RODENKIRCHEN, KAUFMANN, LEE, HENNEKES, 1977). Damit ist weiterhin anzunehmen, daß BAUMANN Nifedipine unter solchen Versuchsbedingungen testete, wie sie bei den eigenen Versuchen mit erhöhtem $(Ca^{2+})_o$ in Abb. 10 dargestellt sind: Wird der Kalziumgehalt im Perfusionsmedium nämlich auf 10 mM erhöht, so stimmen die Resultate von BAUMANN und die eigenen weitgehend überein. Die Verlängerung des Restitutionsprozesses bleibt bestehen, jedoch entsprechen die Kontraktionsamplituden, die nach langen Reizpausen erreicht werden, in etwa denen, die unter Kontrollbedingungen gemessen werden. Das heißt, daß die intrazellulären Speicher nach langen Reizpausen einen bestimmten maximalen Füllungszustand erreicht haben, der dem Füllungszustand unter Kontrollbedingungen entspricht.

Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, daß bei hohem $(Ca^{2+})_o$ der maximale Füllungszustand der intrazellulären Kalziumspeicher durch Nifedipine nicht beeinflußt wird. Die Hemmung des Ca^{2+}-Einwärtsstromes (siehe EHARA und KAUFMANN, 1977) ist in dieser Situation offensichtlich zu gering, um eine Ca^{2+}-Verarmung der Speicher zu bewirken. So kommt es dazu, daß lediglich eine Verlangsamung des Restitutionsprozesses - wie sie auch bei Verapamil besteht - beobachtet werden kann. Wäre zudem die Nifedipinewirkung auf

den Restitutionsprozeß die entscheidende, so müßte ebenso eine Umkehr der AFB unter Nifedipineeinfluß zu registrieren sein, wie sie unter Verapamil auftritt. Dies ist aber nicht der Fall. Dagegen läßt sich die negativ inotrope Wirkung von Nifedipine durch den Entzug von $(Ca^{2+})_o$ - eine experimentelle Maßnahme, die einer Hemmung des transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstroms gleichkommt - praktisch weitgehend darstellen: Die Kontraktionsamplituden werden bei allen Reizfrequenzen etwa gleichmäßig reduziert (siehe Abb. 8) und das Plateau der Restitutionskurve gesenkt (siehe Abb. 11A). Die Zeitkonstante des Restitutionsprozesses ist dagegen in dieser Situation nur unwesentlich vergrößert.

Auch nach diesen Resultaten kann der Wirkmechanismus von Nifedipine in zwei Komponenten aufgegliedert werden:

1) Eine Hemmung der Geschwindigkeit des Restitutionsvorganges, die durch Erhöhung von $(Ca^{2+})_o$ nicht aufgehoben werden kann.
2) Eine Hemmung des langsamen transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstromes, die eine Senkung des maximalen Füllungszustandes der intrazellulären Speicher zur Folge hat. Diese Wirkung ist durch Erhöhung von $(Ca^{2+})_o$ antagonisierbar.

Im Hinblick auf den negativ inotropen Effekt ist die "Ca-antagonistische Wirkung" (Punkt 2) dominierend. Dies ergibt sich auch aus den Experimenten, die zeigen, daß bei hohem $(Ca^{2+})_o$ die Nifedipinewirkung gering ist (siehe Abb. 8B; REFSUM, 1975a). Durch die Ergebnisse von EHARA und KAUFMANN (1977) werden diese Aussagen eindeutig untermauert. So haben diese Autoren anhand von voltage clamp Versuchen gezeigt, daß der langsame transmembranäre Ca^{2+}-Einwärtsstrom durch Nifedipine gehemmt wird, indem diese Substanz die Anzahl der verfügbaren langsamen Membrankanäle frequenzunabhängig reduziert, ohne die spezifischen Kanaleigenschaften zu verändern. Interessanterweise liegt der ED_{50}-Wert für die Beeinflussung

der Ionenleitfähigkeit des langsamen Kanals etwa im gleichen Bereich wie der ED_{50}-Wert für die negativ inotrope Wirkung am Katzenpapillarmuskel (ca. $3x10^{-7}$ M)!

4.2 DIE WIRKUNG ABGEWANDELTER MOLEKÜLSTRUKTUREN AUF DAS ISOLIERTE MUSKELPRÄPARAT

Die Wahl der Tierspezies und des Muskelpräparates für alle pharmakologischen Experimente wurde von der Überlegung geleitet, die ermittelten Versuchsergebnisse auf die Verhältnisse am menschlichen Organismus übertragen zu können. Aufgrund erheblicher morphologischer Abweichungen der Myokardgewebe fanden daher das Kaltblüter- und Nagetiermyokard keine Berücksichtigung. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde der Katzenpapillarmuskel gewählt. Dieses Muskelpräparat zeigt nach TRITTHART, FLECKENSTEIN, KAUFMANN und BAYER (1968) ein ähnliches kontraktiles und elektrophysiologisches Verhalten wie Herzpräparate von Primaten (z.B. von Rhesusaffen). Zudem ist dieser Muskel ein histologisch gründlich untersuchtes Gewebe. Er weist über lange Testzeiten sehr stabile Meßgrößen auf (STRAUER, 1975), ist leicht und ohne Zerstörung von kontraktilem Gewebe präparierbar und liefert wegen seiner gleichmäßigen Anatomie gering streuende biologische Versuchsdaten. Ferner sind bereits pharmakologische Studien mit der Ausgangssubstanz Nifedipine am gleichen Muskel durchgeführt worden (FLECKENSTEIN, TRITTHART, DÖRING und BYON, 1972; STRAUER, 1974), so daß auch aus diesem Grunde die Wahl des Katzenpapillarmuskels für die strukturpharmakologischen Experimente gerechtfertigt erscheint.

Ein geeignetes biologisches Testmodell ist besonders für die qualitativen und quantitativen Struktur-Wirkungsanalysen

von entscheidender Bedeutung. So können relevante Untersuchungsergebnisse nur dann erwartet werden, wenn die Versuchssubstanzen auch in adäquaten Konzentrationen zu ihrem Wirkort gelangen. Dies bedeutet, daß auf dem Weg zwischen Applikationsort und Rezeptor keine metabolischen Zwischenschritte ablaufen dürfen, da Metaboliten selber eine ernstzunehmende Störgröße darstellen können: So muß eine Abnahme der aktuellen Wirkstoffkonzentration am Wirkort bzw. eine gleichgerichtete oder entgegengerichtete Wirkung des Metaboliten in Betracht gezogen werden.

Im Falle der DHP-Derivate kann durch die Versuche mit dem Hauptmetaboliten von Nifedipine (siehe Kapitel 3.1.4) eindeutig ausgeschlossen werden, daß die metabolischen Abbauprodukte dieser Substanzen eine Beeinflussung ihrer Dosis-Wirkungskurven herbeiführen. Ein Abbau von Nifedipine (bzw. seiner Derivate) im Herzmuskel ist kaum wahrscheinlich (Hauptmetabolisationsort: Leber). Durch die Untersuchungen wurde aber sichergestellt, daß das (eventuell im Herzmuskel auftretende) metabolische Abbauprodukt die Nifedipinewirkung am isolierten Katzenpapillarmuskel nicht meßbar beeinflußt. In Kapitel 3.1.4 konnte gezeigt werden, daß der Hauptmetabolit erst in hohen Konzentrationen (10^{-6} M) eine geringfügige Eigenwirkung besitzt (positiv inotrop), und daß durch Zugabe des Metaboliten keine Verschiebung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Nifedipine bewirkt wird.

Generelle Bedenken könnten gegen die biologischen Testdaten (ED_{50}-Werte) erhoben werden, die im Rahmen der QSWA an isolierten Muskeln bestimmt wurden. So sollten im Idealfall nur solche ED_{50}-Werte für eine Korrelation mit physikochemischen Parametern herangezogen werden, die sich von einem einzigen Wirkmechanismus ableiten. Diese Vorbedingung kann z.B. bei bekannten in vitro-Enzymreaktionen leichter erfüllt werden, als bei komplexen biologischen Muskelpräparaten.

Zudem besteht auch bei isolierten Muskelpräparaten die Gefahr, daß möglicherweise durch Verteilung, Speicherung oder andere Folgereaktionen von Stoffen verfälschte, undefinierte Dosis-Wirkungskurven erhalten werden, die natürlich keine sinnvolle QSWA erlauben. Eine einzeln kontrahierende Herzmuskelzelle könnte aus diesen Gründen ein eventuell besser geeignetes Präparat sein.

Gegen diese Einwände muß erwidert werden, daß zwar die Probleme mit Diffusionswegen, der Speicherung oder der Verteilung von Substanzen sowie der Beeinflussung der Reizleitung und des Metabolismus bei Versuchen mit Einzelzellen geringer sind, jedoch bestehen bei diesem biologischen Versuchsmodell zu große versuchstechnische Schwierigkeiten (z.B. Zellzüchtung, Registrierung der Kontraktionen, elektrische Reizung). Experimente mit Einzelzellen durchzuführen erschienen deshalb ungeeignet, die vorgegebene Aufgabenstellung zu bewältigen.

Weiterhin wurden für die QSWA nur solche abgewandelten Molekülstrukturen berücksichtigt, die ein zu Nifedipine und untereinander vergleichbares kontraktiles Wirkmuster besitzen; unter dieser Voraussetzung kann ein einziger Wirkmechanismus für alle Derivate angenommen werden. Ferner wurden nur Papillarmuskeln von übereinstimmenden anatomischen Größen verwendet und für jeden Stoff und für jede Dosierung eine ausreichende Äquilibrierungszeit eingehalten. Somit konnten jeweils adäquate Wirkstoffmengen zur Rezeptorstruktur des Muskels gelangen.

Der Katzenpapillarmuskel hat sich für alle pharmakologischen Untersuchungen als überaus geeignetes Versuchspräparat erwiesen und durch die Ergebnisse der Struktur-Wirkungsanalysen (z.B. Vorhersage von Substanzwirkung, siehe Kapitel 3.4.3)

auch seine Eignung als biologisches Testmodell für die quantitativen pharmakologischen Studien demonstriert.

Betrachtet man zunächst die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Ergebnisse der qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse so zeigt sich, daß vergleichbare Beeinflussungen kontraktiler Phänomene wie sie unter Nifedipine auftreten, nur von solchen Derivaten erwartet werden können, die folgende essentielle Molekülstrukturen besitzen:

1) einen unsubstituierten, sekundären Ring-Stickstoff,
2) einen reduzierten Pyridinring und
3) einen großvolumigen Pyridinringsubstituenten in para-Position.

In einer umfangreichen Studie von LOEV (LOEV, GOODMANN, SNADER, TEDESCHI und MACKO, 1974), der qualitative Zusammenhänge zwischen der blutdrucksenkenden Wirkung und der Struktur von 79 getesteten Dihydropyridinverbindungen untersuchte, werden ähnliche Resultate beschrieben. LOEV verwendete jedoch bei seinen Experimenten das Ganztier als Versuchsobjekt. Dieses unübersichtliche Modell kann verständlicherweise kaum relevante Daten für eine Struktur-Wirkungsuntersuchung liefern. Beim Ganztier sind die Probleme der Diffusion, des Metabolismus und der Speicherung von Substanzen wesentlich unüberschaubarer als dies beim isolierten Muskelpräparat der Fall ist. Zudem muß der biologische Meßparameter "Blutdruck", wie ihn LOEV benutzt hat, sehr kritisch beurteilt werden. Bekanntlich wird diese Meßgröße im Organismus von einer Vielzahl von Einfluß- und Regelgrößen

bestimmt. Im Gegensatz dazu liefert der isolierte Katzenpapillarmuskel definierte inotrope Daten, die in einem direkten Zusammenhang zur Herzwirkung der Testsubstanzen stehen.

Trotz dieser grundsätzlichen Bedenken lassen sich die am Ganztier (Hund, Katze) gewonnenen Ergebnisse zum Teil auch auf die am Papillarmuskel der Katze gewonnenen Daten übertragen. Diese Aussage gilt insbesondere für die von LOEV beschriebene Reihenfolge der Wirksamkeit. Sowohl am Ganztier wie auch am isolierten Muskelpräparat sind die Derivate am wirksamsten, die einen großvolumigen, zyklischen DHP-Ringsubstituenten (z.B. einen substituierten Aromaten) in para-Position tragen. Von diesen Abwandlungsprodukten wiederum haben sich bei beiden Versuchsmodellen die ortho-aryl-substituierten Derivate als stärker wirksam erwiesen als die meta-substituierten; para-substituierte Verbindungen zeigten jeweils die geringste Aktivität. Die aplanare Anordnung der Ringsysteme der DHP-Moleküle vom Nifedipinetyp, die insbesondere von ortho-substituierten aromatischen Ringen bewirkt wird, ist nach den Resultaten von LOEV und den eigenen Versuchsergebnissen für eine optimale pharmakologische Wirkung dieser Stoffklasse essentiell.

Leider standen keine ortho, ortho'-aryl-substituierten Verbindungen für die Untersuchungen am Papillarmuskel zur Verfügung. So können die Versuchsergebnisse von LOEV (1974) über eine sehr hohe Wirksamkeit von entsprechenden chlorierten und methylierten Analogen nicht bestätigt werden. Es ist nach den bisher erhaltenen Resultaten aber zu vermuten, daß bei Verbindungen dieses Typs eine hohe biologische Wirksamkeit auch am isolierten Muskelpräparat besteht, da die freie Drehbarkeit der beiden Ringsysteme extrem behindert ist. Auf den gleichen Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung hat bereits PHILLIPS (1949) hingewiesen, indem er auf diese Abhängigkeit zwischen der Struktur von entsprechenden DHP-Verbindungen und ihrer biologischen Wirkung aufmerksam macht.

Desweiteren können die Aussagen von LOEV bestätigt werden, daß oxidierte DHP-Analoge und Derivate mit substituierten zyklischen Stickstoffatomen schwach wirksame Substanzen sind (siehe Versuchsergebnisse mit den Substanzen VS-200 und VS-300, Kapitel 3.2.1). Auch die Resultate mit dem Hauptmetaboliten von Nifedipine (siehe Kapitel 3.1.4) können in derartige qualitative Struktur-Wirkungsbetrachtungen einbezogen werden: So zeigt dieses oxidierte DHP-Molekül (am Hund um zwei Zehnerpotenzen schwächer wirksam als Nifedipine (MEDENWALD, SCHLOSSMANN und WÜNSCHE, 1972)) am isolierten Katzenpapillarmuskel erst in sehr hohen Dosisbereichen ($>10^{-5}$ M) eine negativ inotrope Wirkung.

Die Strukturvariation der Estergruppen beschränkt sich bei den pharmakologischen Untersuchungen von LOEV auf den Austausch von methyl-, äthyl- und tertiären butyl-Resten. Nach diesen Untersuchungen ergaben sich am anästhesierten Ganztier geringe Wirkdifferenzen zwischen methylierten und äthylierten Verbindungen, die i.v. verabreicht wurden, während bei oraler Anwendung die Äthylester die wirksamsten Analoge darstellten. Diese letzte Aussage steht in scheinbarem Widerspruch zu den Ergebnissen am Papillarmuskel. Betrachtet man die Daten der dünnschichtchromatographischen Bestimmungen zur Erstellung eines lipophilen Verteilungsmusters für sämtliche getesteten Abwandlungsprodukte (Kapitel 3.3), so wird jedoch dieses abweichende Resultat erklärbar.

Die Substanz VS-023 (eine Methyl- und Äthylestergruppe) hat einen R_M-Wert von 0.87, während die biologisch schwächer wirksame analoge Substanz VS-009 (Dimethylestergruppen) einen R_M-Wert von 0.72 besitzt. Das heißt, daß am isolierten Muskel mit steigender Lipophilie der Derivate deren biologische Wirksamkeit sinkt. Eine genau umgekehrte Beziehung liegt dagegen am Ganztier vor, wo Transportfaktoren und damit lipophile Substituenteneinflüsse eine wichtigere Rolle spielen.

Da ein Pharmakon in einem Gesamtorganismus eine größere Anzahl von Membranpassagen durchlaufen muß, um zu seinen Rezeptorstrukturen zu gelangen als bei einem isolierten Muskel, ist auch dieser scheinbar "gegensätzliche" Befund verständlich.

Alle diese qualitativen Aussagen, die sich entweder auf die blutdrucksenkende Wirkung oder auf den negativ inotropen Effekt von Strukturanalogen bezogen haben, lassen sich sinngemäß ebenso auf die Effekte dieser Substanzen auf die AFB, die Restitutionskinetik und die transitorischen Treppen anwenden. So finden sich Beeinflussungen der oben erwähnten kontraktilen Phänomene (siehe Kapitel 3.1) nur bei den Abwandlungsprodukten, die die angeführten essentiellen molekularen Voraussetzungen erfüllen. Der Grad der Beeinflussung hängt ebenfalls in erster Linie vom Substitutionsort und in zweiter Linie von den physikochemischen Eigenschaften der Substituenten am Aromaten ab. Auch bei diesen inotropen Effekten gilt für die Wirksamkeit der Derivate die Reihenfolge des Substitutionsortes am Aromaten: ortho > meta > para.

Die sterischen Substituenteneigenschaften von aryl-substituierten Derivaten sind demnach die entscheidenden Einflußgrößen für ein breites Spektrum biologischer Wirkungen. Die elektronischen Substituenteneigenschaften lassen nach diesen qualitativen Analysen keinen Zusammenhang mit der Wirkung erkennen, zumal Substituenten mit unterschiedlichen induktiven und mesomeren Eigenschaften kein unterschiedliches Wirkbild des Gesamtmoleküls hervorrufen. Lipophile Substituenteneinflüsse gewinnen durch die Ester-abgewandelten Derivate (siehe Kapitel 3.3) für die Wirkintensität große Bedeutung. Die genauen quantitativen Zusammenhänge zwischen Struktur und Wirkung lassen sich allerdings erst durch die Methode der Hansch-Analyse statistisch absichern.

4.3 DIE ANWENDUNG DER HANSCH-ANALYSE

In den letzten Jahren sind für die verschiedensten biochemischen Reaktionen und unterschiedlichsten Substanzklassen quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen beschrieben worden. Durch diese neue Analysenmethode konnten die biologischen Wirkungen noch nicht getesteter Verbindungen vorhergesagt, nähere Aussagen über Rezeptoreigenschaften getroffen sowie die entscheidenden Substituenteneinflüsse von Pharmaka erfaßt werden. Für die ständig an Bedeutung gewinnende Verbindungsklasse der sogenannten Ca-Antagonisten ist bisher erst im Falle des Pharmakons Verapamil eine derartige QSWA durchgeführt worden (MANNHOLD, 1977), während für Nifedipine, den potentesten Wirkstoff dieser Verbindungsgruppe, noch keine quantitative Struktur-Wirkungsanalysen publiziert wurden.

Nachdem in der Vergangenheit ausführlich die qualitativen Wirkunterschiede von Ca-antagonistischen Pharmaka beschrieben worden sind (BAYER, RODENKIRCHEN, EHARA und MANNHOLD, 1976), eröffnet sich nun durch die Methode der QSWA zusätzlich die Möglichkeit, auch die jeweiligen substanzspezifischen physikochemischen Voraussetzungen der Molekülwirkungen zu erfassen.

Bei der Durchführung einer QSWA können neben den bereits angeführten Schwierigkeiten (Testmodell, Zufalls- und Überkorrelationen, Metabolismus) noch weitere Detailprobleme auftreten: So sollte man für alle DHP-Substituenten die numerischen Daten von physikochemischen Parametern verwenden, die an einem zu Nifedipine vergleichbaren molekularen Grundgerüst erarbeitet wurden. In diesem Fall wären die gesamten sterischen, lipophilen und elektronischen Moleküleigenschaften (intramolekulare Wechselwirkungen) auch für den einzelnen Substituentenparameter mitberücksichtigt. Gegen eine Übertragung dieser Daten auf die untersuchten Abwandlungsprodukte

gäbe es keine Einwände. Da eigene experimentelle Bestimmungen der einzelnen elektronischen und sterischen Substituenteneinflüsse den gesteckten Rahmen der vorliegenden Arbeit überschritten hätten, wurden für diese Parameter ausschließlich Literaturdaten verwendet. Bei der Auswahl dieser Daten wurde den oben angeführten Überlegungen weitgehend Rechnung getragen.

Im Falle der für jede QSWA wichtigen lipophilen Substituenteneinflüsse ist jedoch ein Verteilungsmuster aller DHP-Derivate erstellt worden (siehe Kapitel 2.5). Auch bei HANSCH (HANSCH und FUJITA, 1964; HANSCH, LEO, UNGER, KIM, NIKAITANI und LIEN, 1973) bildet die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von biologischen Wirkstoffen eine Grundlage der quantitativen Struktur-Wirkungsarbeiten. Die Methodik, mit der HANSCH seine Lipophiliekonstanten bestimmt, beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der Derivate in einer Wasser- und einer Octanolphase. Dieses Verfahren erwies sich für viele extrem lipidlöslichen DHP-Derivate als ungeeignet, da keine meßbare Anreicherung der Stoffe in der hydrophilen Pufferphase erfolgte. Wie von BIAGI (BIAGI, GUERRA und BARBARO, 1970) und anderen Autoren gezeigt (SEYDEL, SCHAPER, WEMPE und CORDES, 1975), kann man strukturell ähnliche Verbindungen auch auf imprägnierten Kieselgelplatten schnell, mit hoher Trennschärfe und großer Nachweisempfindlichkeit verteilen. Die Lipophilie der Derivate steht in einem definierten Verhältnis zu ihren Wanderungsstrecken auf dem Chromatogramm (BÜCHI und FRESEN, 1966). Im Falle der DHP-Abwandlungsprodukte schwankten die nach dieser Analysenmethode bestimmten R_F-Werte zum Teil erheblich um ihre statistischen Mittelwerte, so daß mehr als vier Einzelbestimmungen pro Derivat erforderlich waren. Da man als Ursache für die breite Streuung der Lipophiliewerte eine mangelhafte Imprägnierung der Fertigplatten annehmen kann, dürfte die Verwendung silanisierter DC-Fertigplatten für die Phasenumkehrchromatographie geeigneter sein. Im Vergleich zu den mengenmäßig undefinierten Paraffinbeschichtungen bietet der definierte Hydrophobierungs-

grad sowie die hydrolysebeständige chemische Bindung von silanisiertem Kieselgel (Ersatz der polaren Silanolgruppen durch die unpolaren Dimethylsilylgruppen) erhebliche Vorteile. Die hohen Interkorrelationskoeffizienten, die schließlich zwischen den chromatographisch bestimmten Lipophiliewerten und den entsprechenden Literaturdaten (π-Werte) erhalten worden sind (siehe Kapitel 3.4.1; 3.4.2) weisen auf die berechtigte Verwendung der selbst bestimmten Lipophiliewerte hin.

Grundsätzlich ist an die Auswahl der Substituenten die Forderung geknüpft, über möglichst unterschiedliche lipophile, elektronische und sterische Eigenschaften zu verfügen. So kann keine QSWA die Einflußgrößen der erwähnten Substituenteneigenschaften näher definieren, wenn die Substituenten selber zu ähnliche Eigenschaften besitzen. Wie die Zusammenstellung aller korrelierten Daten in den Tabellen 12 und 15 ausweisen, ist diese Forderung - mit Ausnahme der van der Waals Radien der Tabelle 15 - weitgehend erfüllt. Die signifikanten Korrelationsergebnisse (Kapitel 3.4.2) mit dem Term r_w = van der Waals Radius sind deswegen weit weniger geeignet sterische Substituenteneinflüsse zu beschreiben als die Resultate, die den Term V_w = van der Waals Volumen beinhalten.

Faßt man sämtliche Korrelationsergebnisse zusammen (Kapitel 3.4.2), so kann eindeutig festgestellt werden, daß die biologische Aktivität dieser Derivategruppe zum größten Teil von den sterischen Substituenteneinflüssen bestimmt wird. Ortho- und meta-Phenylsubstituenten erschweren offenbar die freie Drehbarkeit der beiden Ringsysteme des DHP-Wirkmoleküls und ermöglichen damit eine bessere Anpassung an Rezeptorstrukturen als dies bei para-substituierten Derivaten der Fall ist. So kann die Varianz der Wirkung zu 92% mit dem sterischen Substituenteneinfluß (V_w) im Falle ortho-aryl-substituierter Derivate erklärt werden; für ortho- und meta-aryl-substitu-

ierte Abwandlungsprodukte jedoch nur noch zu 71% und für ortho-, meta- und para-aryl-substituierte Verbindungen sogar lediglich zu 66%. Konnte dieser Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung nach den Resultaten der qualitativen Analysen nur vermutet werden, so ist durch die QSWA und damit durch die exakten mathematisch-statistischen Methoden der Hansch-Analyse der direkte Beweis für die Bedeutung des sterischen Substituenteneinflusses geliefert worden.

Neben der Gefahr, bei einer QSWA Überkorrelationen durch eine zu geringe Anzahl eingesetzter Derivate pro Parameter zu erhalten, besteht eine weitere Fehlerquelle in der gleichzeitigen Verwendung (multiple Regressionsanalyse) solcher Parameter, die untereinander korrelieren. So liegen unter anderem Interkorrelationen zwischen π und E_S, π und MV (CRAIG, 1971), μ und σ (CAMMARATA, ALLEN, SEYDEL und WEMPE, 1970), π und V_w, R_M und E_S, R_M und V_w (SEYDEL, SCHAPER, WEMPE und CORDES, 1976) vor. In dieser Situation stellen die von CRAIG (1971) publizierten Diagramme (siehe Abb. 22) eine überaus wertvolle Hilfe dar. Für eine Vielzahl von σ- und π-Werten können in diesen Diagrammen mögliche wechselseitige Beeinflussungen an ihren linearen Beziehungen erkannt werden. Im Falle einer Substituentenauswahl sollten nur solche Substituenten gewählt werden, die möglichst unregelmäßig über das Koordinatenkreuz verstreut liegen und die nicht nur aus einem Quadranten stammen. Da jedoch derartige Diagramme nur für wenige Parameterkombinationen vorliegen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausführliche Interkorrelationsanalysen erstellt. Wie die Ergebnisse dieser Berechnungen ausweisen, finden die folgenden erwähnenswerten signifikanten Interkorrelationen statt: Zwischen dem Parameter des sterischen Substituenteneinflusses V_w und den lipophilen Substituenteneinflüssen R_M bzw. π (Variationen der Estergruppe, Kapitel 3.4.1). Aus diesem Grunde dürfen in einer multiplen Regressionsanalyse V_w und R_M bzw. π nicht zusammen

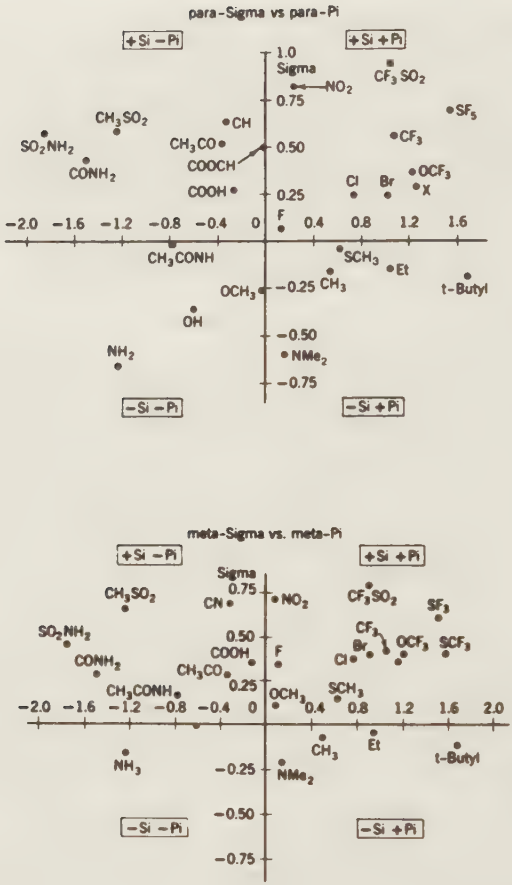


Abb. 22: Graphische Darstellung der gegenseitigen Abhängigkeit von para- π und para-σ (oberes Diagramm) sowie von meta- π und meta-σ Substituentenwerten (unteres Diagramm) nach CRAIG (1971).

eingesetzt werden. Leider kann für die Derivate dieser Gruppe nicht eindeutig entschieden werden, ob der sterische und/oder der lipophile Einfluß der variierten Gruppen für die biologische Wirkung bestimmend ist (RODENKIRCHEN, MÖLLER, STEINER und BAYER, 1977). Nur durch die Erweiterung der QSWA um Substituenten mit unterschiedlichen lipophilen und/oder sterischen Eigenschaften wäre diese Frage zu entscheiden; zwischen den bisher verwendeten Resten treten zu große sterische und lipophile Wechselwirkungen auf.

Betrachtet man die Interkorrelationsergebnisse, die von den einzelnen Parametern im Falle variierender Substituenten am Aromaten erhalten werden (Kapitel 3.4.2), so liegt die folgende Situation vor: π^2 und r_w sowie ΔR_M^2 und r_w dürfen nicht im Rahmen einer multiplen Regressionsanalyse verwendet werden. Alle übrigen Parameter weisen keine signifikanten Interkorrelationen auf. Die im Text dargestellten multiplen Regressionen sind nicht nur für ortho-substituierte, sondern auch für alle am Aromaten abgewandelten Analoge gültig. Eine erweiterte Interkorrelationsanalyse mit den numerischen Beträgen von ortho- und meta-ständigen Substituenten erbrachte die entsprechenden Resultate.

Durch die multiplen Regressionsanalysen mit aryl-substituierten Verbindungen wird die entscheidende Bedeutung des sterischen Substituenteneinflusses für die biologische Wirkung unterstrichen. Eine untergeordnete Rolle spielen die lipophilen Einflüsse. Die signifikanten Korrelationen mit dem Parameter für elektronische Einflüsse, μ^2, sollten mit Skepsis betrachtet werden. Zwar hat McFARLAND (1971) einige Korrelationen mit diesem Term erfolgreich durchgeführt, doch nach FRANKE und OEHME (1973) reichen diese Beispiele nicht aus, das Gruppendipolmoment im Rahmen einer Hansch-Analyse als universellen Term für elektronische Einflüsse zu verwenden.

Vergleicht man die Korrelationskoeffizienten der einfachen Regressionsanalysen mit den entsprechenden Korrelationskoeffizienten der multiplen Regressionsanalysen, so fällt auf, daß zwischen beiden Größen meist ein geringer Unterschied besteht. Durch einen zusätzlichen sequentiellen F-Test konnte in diesen Fällen gezeigt werden, daß die erweiterten Analysen keine signifikanten Verbesserungen gegenüber den einfachen Regressionen erbringen.

Zur weiteren Interpretation der Ergebnisse der Hansch-Analyse müssen auch die Vorzeichen von Regressionskoeffizienten herangezogen werden. So bedeuten die negativen Vorzeichen der Regressionskoeffizienten für R_M und V_w (im Falle einer QSWA mit variierenden Estergruppen, Kapitel 3.4.1), daß die biologische Wirkung dieser analogen Verbindungsreihe mit abnehmender Lipophilie und/oder abnehmender Substituentengröße steigt. Ein solcher Zusammenhang zwischen Struktur, physikochemischer Eigenschaft und Wirkung wäre sehr gut erklärbar: Eine zu hohe Fettlöslichkeit kann durch zu starke Bindung an Eiweiße und Fette ebenso wie großvolumige Substituenten die Penetration des Wirkstoffs zur Rezeptorstruktur erschweren.

Die zu diesen Resultaten genau umgekehrten Beziehungen erbringen die Korrelationen mit aryl-substituierten DHP-Verbindungen (Kapitel 3.4.2): Sowohl die Regressionskoeffizienten des Terms R_M als auch die Regressionskoeffizienten der Terme V_w und r_w weisen positive Vorzeichen auf. Das heißt, daß bei diesen analogen Abwandlungsprodukten die biologische Wirkung mit der Größe des Ringsubstituenten und in geringerem Maße mit steigender Lipophilie zunimmt. Ein großvolumiger Substituent am Aromaten behindert nicht die Penetration des Wirkmoleküls, sondern schafft offenbar insbesondere in ortho-Position die sterischen Voraussetzungen (GILL, 1965) für eine optimale Rezeptoranpassung (aplanare Anordnung der beiden Ringsysteme).

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit qualitativen und quantitativen pharmakologischen Untersuchungen zur negativ inotropen Wirkung des neuen Koronartherapeutikums Nifedipine (1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester). Nifedipine wird der Gruppe der sogenannten Ca-Antagonisten zugerechnet. In dieser Gruppe finden sich jedoch chemisch überaus unterschiedliche Substanzen mit verschiedenen inotropen Wirkmustern. Der postulierte gemeinsame molekulare Wirkmechanismus (die alleinige Inhibition des langsamen Ca^{2+}-Einwärtsstroms in die erregte Herzmuskelzelle bzw. in die glatte Muskelzelle) kann aus diesen Gründen kaum wahrscheinlich sein. Die Aufgabenstellung lautete daher, für Nifedipine das spezifische inotrope Wirkmuster zu erstellen, molekulare Wirkmechanismen näher zu beschreiben und die essentiellen physikochemischen Molekül- und Substituenteneigenschaften zu erfassen.

Die Untersuchung gliedert sich im wesentlichen in 3 Hauptabschnitte: Im ersten Teil wurde der Nifedipineeinfluß auf die stationäre Amplituden-Frequenzbeziehung, das Amplituden-Pausenverhalten, die transitorischen Phänomene nach Reizfrequenzerhöhung sowie das Verhalten isolierter Katzenpapillarmuskeln bei variierenden extrazellulären Ca^{2+}-Konzentrationen analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß

1) Nifedipine hauptsächlich den langsamen, erregungsbedingten Ca^{2+}-Einwärtsstrom hemmt. Diese Nifedipinewirkung ist durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration antagonisierbar und (im Gegensatz zur Wirkung des Ca-Antagonisten Verapamil) frequenzunabhängig,
2) Nifedipine in wesentlich geringerem Maße auch Prozesse der intrazellulären Ca^{2+}-Wiederverfügbarkeit beeinflußt.

Diese Nifedipinewirkung ist jedoch mit hohen Ca^{2+}-Konzentrationen (> 10 mM) nicht antagonisierbar.

Der zweite Teil der Arbeit beschreibt die qualitativen Struktur-Wirkungsanalysen mit 27 Dihydropyridinderivaten. Durch diese Untersuchungen wurden folgende essentiellen Molekülstrukturen für die charakteristische Nifedipinewirkung am Katzenpapillarmuskel aufgezeigt:

1) unsubstituierter, sekundärer Ringstickstoff,
2) 1,4-Dihydropyridinringstruktur und
3) großvolumiger Substituent (z.B. ortho-substituierter Aromat) in para-Stellung am Dihydropyridinring.

Im dritten Teil konnten schließlich mit Hilfe der Hansch-Analyse physikochemische Substituenteneigenschaften in eine quantitative Relation zur negativ inotropen Nifedipinewirkung gesetzt werden. So bedingt im Falle der Derivate mit abgewandelten Estergruppen

1) eine steigende Lipophilie und/oder ein zunehmendes Volumen der Estergruppierungen eine Minderung der biologischen Wirksamkeit.

Am Aromaten sind die sterischen Einflüsse der Substituenten für die typische Nifedipinewirkung wesentlich bedeutsamer als die lipophilen und insbesondere die elektronischen Eigenschaften. Bei diesen analogen Abwandlungsprodukten korreliert

2) ein steigendes Volumen und eine zunehmende Lipophilie der Substituenten (in ortho-Position) mit einer wachsenden biologischen Wirkung.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) ANTONI, H., JAKOB, R., KAUFMANN, R. (1969)
Mechanische Reaktionen des Frosch- und Säugetiermyokards bei Veränderung der Aktionspotential-Dauer durch konstante Gleichstromimpulse.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 306, 33-57

2) BASSINGTHWAIGHTE, J.B., REUTER, H. (1972)
Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells.
In: Electrical Phenomena in the Heart (ed.: W.C. de Mello), Academic Press, London-New York

3) BATE-SMITH, E.C., WESTALL, R.G. (1950)
Chromatographic behaviour and chemical structure.
I. Some naturally-occuring phenolic substances.
Biochim. Biophys. Acta 4, 427-440

4) BAUMANN, K. (1976)
On the action of nifedipine under conditions of variable stimulation patterns and $(Ca^{2+})_o$ in guinea-pig atrium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294, 161-168

5) BAYER, R. (1977)
Aktivierung und Kontrolle der Herzmuskelkontraktion auf zellulärer Ebene. Experimentelle Untersuchungen und Modellvorstellungen zur elektromechanischen Koppelung am isolierten Warmblütermyokard.
Habilitationsschrift, Universität Düsseldorf

6) BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975a)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium (I). Pattern of inotropic effects of the racemic compounds.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 49-68

7) BAYER, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975b)
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium (II). Pattern of inotropic effects of the optical isomers.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 69-80

8) BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., EHARA, T., MANNHOLD, R. (1976)
Comparative studies of inotropic and electrophysiological effects of "slow channel inhibitors" in isolated mammalian cardiac muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 293, R 21

9) BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., KAUFMANN, R., LEE, J.H., HENNEKES, R. (1977)
The effects of nifedipine on contraction and monophasic action potential of isolated cat myocardium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (im Druck)

10) BELGIUM PATENT No. 689377 (1967)
Firma BAYER AG., BOSSERT, F., VATER, W.

11) BIAGI, G.L., GANDOLFI, O., GUERRA, M.C., BARBARO, A.M., CANTELLI-FORTI, G. (1975)
R_M values of phenols. Their relationship with log P values and activity.
J. Med. Chem. 18, 868-882

12) BIAGI, G.L., GUERRA, M.C., BARBARO, A.M. (1970)
Relationship between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone and testosterone esters.
J. Med. Chem. 13, 944-948

13) BLINKS, J.R., KOCH-WESER, J. (1961)
Analysis of the effects of changes in rate and rhythm upon myocardial contractility.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 134, 373-389

14) BLINKS, J.R., KOCH-WESER, J. (1963)
Physical factors in the analysis of the actions of drugs on myocardial contractility.
Pharmacol. Rev. 15, 531-599

15) BONDI, A. (1964)
Van der Waals volumes and radii.
J. Phys. Chem. 68, 441-451

16) BONDI, A. (1968)
In: Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses.
John Wiley and Sons, Inc. New York-London-Sidney

17) BOSSERT, F. (1975)
In: The Chemistry of Nifedipine (eds.: W. Lochner, W. Braasch and G. Kroneberg), 2nd International Adalat Symposium, October 4 - 5 (1974), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 20-26

18) BOSSERT, F., VATER, W. (1971)
Dihydropyridine, eine Gruppe stark wirksamer Coronartherapeutika.
Naturwiss. 58, 578

19) BROWN, A.C., FRASER, T. (1869)
On the connexion between chemical constitution and physiological action.
Part 1. On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia and nicotia.
Trans. Roy. Soc. (Edinburgh) 25, 151-204

20) BÜCHI, J., FRESEN, J.A. (1966)
Dünnschichtchromatographische Untersuchungen an homologen und analogen Lokalanästhetica-Reihen.
Pharm. Acta Helv. 41, 551-574

21) CAMMARATA, A., ALLEN, R.C., SEYDEL, J.K., WEMPE, E. (1970)
Cautions regarding the physical interpretation of statistically based structure-activity relationships.
J. Pharm. Sci. 59, 1496-1499

22) CHAPMAN, R.A., NIEDERGERKE, R. (1970)
Interaction between heart rate and calcium concentration in the control of contractile strength of the frog heart.
J. Physiol. 211, 423-443

23) CRAIG, P.N. (1971)
Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies.
J. Med. Chem. 14, 680-684

24) DRUCKREY, E. (1975)
Regressionsanalyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen.
Pharm. Unserer Zeit 4, 145-150

25) EBASHI, S. (1961)
Calcium binding activity of vesicular relaxing factor.
J. Biochem. 50, 236-244

26) EBASHI, S., ENDO, M. (1968)
Calcium ion and muscle contraction.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 18, 125-183

27) EBASHI, S., MASAKI, T., TSUKUI, R. (1974)
Cardiac contractile proteins.
In: The Myocardium.
Adv. Cardiol. 12, 59-69

28) EHARA, T., KAUFMANN, R. (1977)
Effects of nifedipine on membrane currents in isolated cat ventricular myocardium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (im Druck)

29) EXNER, O. (1967)
Additive physical properties. II. Molarvolume as an additive property.
Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1-22

30) FABIATO, A., FABIATO, F. (1972)
Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibres with disrupted or closed sarkolemmas. Calcium dependent cyclic and tonic contractions.
Circ. Res. 31, 293-307

31) FABIATO, A., FABIATO, F. (1973)
Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardioactive drugs.
Eur. J. Cardiol. 1/2, 143-155

32) FABIATO, A., FABIATO, F. (1975)
Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.
J. Physiol. 249, 469-495

33) FLECKENSTEIN, A. (1964)
Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myokards.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med., 70. Kongreß, 81

34) FLECKENSTEIN, A., FLECKENSTEIN-GRÜN, G. (1977)
Zur kombinierten Anwendung von Herzglykosiden und Ca^{++}-Antagonisten.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 27, 736-742

35) FLECKENSTEIN, A., GRÜN, G., TRITTHART, H., BYON, K., HARDING, P. (1971)
Uterus-Relaxation durch hochaktive Ca^{++}-antagonistische Hemmstoffe der elektro-mechanischen Koppelung wie Isoptin (Verapamil, Iproveratril), Substanz D 600 und Segontin (Prenylamin).
Klin. Wschr. 49, 32-41

36) FLECKENSTEIN, A., KAMMERMEIER, H., DÖRING, H.J., FREUND, H.J. (1967)
Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatatoren mit gleichzeitig Sauerstoff-einsparenden Myokard-Effekten, Prenylamin und Iproveratril.
Zeitschr. Kreislaufforsch. 56, 716-744, 839-858

37) FLECKENSTEIN, A., TRITTHART, H., FLECKENSTEIN, B., HERBST, A., GRÜN, G. (1969)
Selektive Hemmung der Myokard-Kontraktilität durch kompetitive Ca^{++}-Antagonisten (Iproveratril, D 600, Prenylamin).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 264, 227- 228

38) FLECKENSTEIN, A., TRITTHART, H., DÖRING, H.J., BYON, K.Y. (1972)
BAY a 1040 - ein hochaktiver Ca^{++}-antagonistischer Inhibitor der elektro-mechanischen Koppelungsprozesse im Warmblütermyokard.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 22-23

39) FORD, L.E., PODOLSKY, R.J. (1970)
Regenerative calcium release within muscle cells.
Science 167, 58-59

40) FRANKE, R., OEHME, P. (1973)
Aktuelle Probleme der Wirkstofforschung.
1. Mitteilung: Ermittlung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei Biowirkstoffen: Theoretische Grundlagen, Durchführung, Voraussetzungen und gegenwärtiger Stand.
Pharmazie 28, 489-508

41) FUJITA, T., IWASA, J., HANSCH, C. (1964)
A new substituent constant, π , derived from partition coefficients.
J. Am. Chem. Soc. 86, 5175-5180

42) GILL, E.W. (1965)
Drug receptor interactions.
Prog. Med. Chem. 4, 39-85

43) GLITSCH, H.G., REUTER, H., SCHOLZ, H. (1970)
The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles.
J. Physiol. (Lond.) 209, 25-43

44) GODFRAIND, T., KABA, A. (1972)
The role of calcium in the action of drugs on vascular smooth muscle.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. Suppl. 196, 35-49

45) GRÜN, G. FLECKENSTEIN, A. (1971)
Ca-antagonism, a new principle of vasodilatation.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. 270, R 48

46) GRÜN, G., FLECKENSTEIN, A. (1972)
Die elektromechanische Entkoppelung der glatten Gefäßmuskulatur als Grundprinzip der Coronardilatation durch Nifedipine.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 334-344

47) HAAS, H.G., KERN, R., BENNINGER, Ch., EINWÄCHTER,H.M. (1975)
Effects of prenylamin on cardiac membrane currents and contractility.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 192,3, 688-701

48) HANSCH, C. FUJITA, T. (1964)
$\rho - \sigma - \pi$ analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure.
J. Am. Chem. Soc. 86, 1616-1626

49) HANSCH, C. LEO, A., UNGER, S.H., KIM, K.H., NIKAITANI, D., LIEN, E.J. (1973)
"Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations.
J. Med. Chem. 16, 1207-1216

50) HANSCH, C., MUIR, R.M., FUJITA, T., MALONEY, P.P., GEIGER, F., STREICH, M. (1963)
The correlation of biological activity of plant growth regulators and chloromycetin derivatives with Hammett constants and partitition coefficients.
J. Am. Chem. Soc. 85, 2817-2824

51) HASHIMOTO, K., TAIRA, N., CHITA, S., HASHIMOTO, K.jr. (1972)
Cardiohemodynamic effects of BAY a 1040 in the dog.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 15-21

52) HASSELBACH, W., MAKINOSE, M. (1961)
Die Calciumpumpe der "Erschlaffungsgrana" des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung.
Biochem. Z. 333, 518-528

53) HOMBURGER, H., SCHLEIERMACHER, W., ANTONI, H. (1973)
Time course of postextrasystolic potentiation in isolated atrial and ventricular myocardium of guinea pig as influenced by changes in frequency, in calcium,and by caffeine.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. Suppl. 339, R 5

54) JETLEY, M., WESTON, A.H. (1976)
Some effects of D 600, nifedipine and sodium nitroprusside on electrical and mechanical activity in rat portal vein.
Brit. J. Pharmacol. 58, 287-288

55) KAUFMANN, R., BAYER, R., FÜRNISS, T., KRAUSE, H., TRITTHART, H. (1974)
Calcium-movements controlling cardiac contractility. II. Analog computation of cardiac excitation-contraction coupling on the basis of calcium kinetics in a multi-compartment model.
J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 543-559

56) KAUFMANN, R., TRITTHART, H., ROST, B. (1969)
Trennung der Ca^{++}-antagonistischen Wirkungskomponente von den ß-adrenolytischen Effekten Herz-hemmender Pharmaka an Kulturen embryonaler Herzmuskelzellen.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 264, 252-253

57) KOCH-WESER, J., BLINKS, J.R. (1963)
The influence of the interval between beats on myocardial contractility.
Pharmacol. Rev. 15, 601-652

58) KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H., FLECKENSTEIN, A. (1972)
Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 335, 309-322

59) KOHLHARDT, M., BAUER, B., KRAUSE, H., FLECKENSTEIN, A. (1973)
Selective inhibition of the transmembrane Ca-conductivity of mammalian myocardial fibres by Ni, Co, and Mn ions.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 338, 115-123

60) KOHLHARDT, M., KRAUSE, H., KÜBLER, M., HERDEY, A. (1975)
Kinetics of inactivation and recovery of the slow inward current in the mammalian ventricular myocardium.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 355, 1-17

61) KUTTER, E., HANSCH, C. (1969)
The use of substituent constants in the quantitative treatment of hapten-antibody interaction.
Arch. Biochem. Biophys. 135, 126-135

62) KUTTER, E., HANSCH, C. (1969)
Steric parameters in drug design. Monoamine oxidase inhibitors and antihistamines.
J. Med. Chem. 12, 647-652

63) LEO, A., HANSCH, C., CHURCH, C. (1969)
Comparison of parameters currently used in the study of structure-activity relationships.
J. Med. Chem. 12, 766-771

64) LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D. (1971)
Partition coefficients and their uses.
Chem. Rev. 71, 525-616

65) LINDER, A. (1964)
In: Statistische Methoden.
Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart, 4. Auflage, 465-468

66) LOEV, B., EHRREICH, S.J., TEDESCHI, R. (1972)
Dihydropyridines with potent hypotensive activity prepared by the Hantzsch reaction.
J. Pharm. Pharmac. 24, 917-918

67) LOEV, B., GOODMAN, M.M., SNADER, K.M., TEDESCHI, R., MACKO, E. (1974)
Hantzsch-type dihydropyridine hypotensive agents.
J. Med. Chem. 17, 956-965

68) MAKINOSE, M. (1971)
Calcium efflux dependent formation of ATP from ADP and orthophosphate by the membranes of the sarcoplasmic vesicles.
FEBS Letters 12, 269-278

69) MANNHOLD, R. (1977)
Investigations on the structure-activity relationship of verapamil.
In Vorbereitung zur Publikation.

70) MANRING, A., HOLLANDER, P.B. (1971)
The interval-strength relationship in mammalian atrium: A calcium exchange model.
Biophys. J. 11, 483-501

71) MARKS, G.S., HUNTER, E.G., TERNER, V.K., SCHNECK, D. (1965)
Studies of the relationship between chemical structure and porphyria-inducing activity.
Biochem. Pharmacol. 14, 1077-1084

72) MEDENWALD, H., SCHLOSSMANN, K., WÜNSCHE, C. (1972)
Strukturaufklärung der renalen Ausscheidungsprodukte von 4-(2'-Nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 53-56

73) MEYER, H. (1899)
Zur Theorie der Alkoholnarkose.
Erste Mitteilung: Welche Eigenschaft der Anaesthetica bedingt ihre narkotische Wirkung?
Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 42, 109-118

74) McFARLAND, J.W. (1970)
On the parabolic relationship between drug potency and hydrophobicity.
J. Med. Chem. 13, 1192-1196

75) McFARLAND, J.W. (1971)
On the understanding of drug potency.
Prog. Drug Res. 15, 123-146

76) MORAD, M., GOLDMAN, Y. (1973)
Excitation-contraction coupling in heart muscle: Membrane control of development of tension.
Prog. Biophys. Mol. Biol. 27, 257-313

77) NORRINGTON, F.E., HYDE, R., WILLIAMS, S., WOOTTON, R. (1975)
Physicochemical-activity relations in practice.
1. A rational and self-consistent data bank.
J. Med. Chem. 18, 604-607

78) OVERTON, E. (1899)
Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie.
Viertelj. Schr. Naturforsch. Ges. (Zürich) 44, 88-135

79) PHILLIPS, A. (1949)
Hantzsch's pyridine synthesis.
J. Am. Chem. Soc. 71, 4003-4007

80) PHILLIPS, A.P., RANDALL, L.D. (1944)
U.S. Patent 2.359.324

81) QUINN, F.R., DRISCOLL, J.S., HANSCH, C. (1975)
Structure-activity correlations among rifamycin B amides and hydrazides.
J. Med. Chem. 18, 332-339

82) RABERGER, G., KRAUPP, O. (1971)
Enhancement of the coronary dilatator effect of intravenous and intracoronary administered adenosine by hexobendine in dogs.
Eur. J. Pharmacol. 13, 312-319

83) RAFF, W.K., KOSCHE, F., LOCHNER, W. (1972)
Untersuchungen mit Nifedipine, einer coronargefäßerweiternden Substanz mit schneller sublingualer Wirkung.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22 33-38

84) REFSUM, H. (1975)
The effect of a calcium-antagonistic drug, nifedipine, on the rat atrial action potential at different calcium levels.
Acta Pharmacol. Toxicol. 37, 329-335

85) REFSUM, H., LANDMARK, K. (1975)
The effect of a calcium-antagonistic drug, nifedipine, on the mechanical and electrical activity of the isolated rat atrium.
Acta Pharmacol. Toxicol. 37, 369-378

86) REUTER, H., SEITZ, N. (1968)
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol. 195, 451-470

87) RODENKIRCHEN, R., MÖLLER, E., STEINER, R., BAYER, R. (1977)
Studies on structure-activity relationships of nifedipine.
Joint Meeting of German and Italian Pharmacologists, Venedig.

88) ROSENKRANZ, H., SCHLOSSMANN, K., SCHOLTAN, W. (1974)
Die Bindung von 4-(2'-Nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester (Nifedipine) sowie von anderen koronarwirksamen Stoffen an die Eiweißkörper des Serums.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 24, 455-466

89) ROSS, W.C.J. (1966)
The preparation of some 4-substituted nicotinic acids and nicotinamides.
J. Chem. Soc. C, 1816-1821

90) SCHNEIDER, K.W., JESSE, R. (1972)
Der Informationswert der Änderung der zentralen Hämodynamik nach Applikation eines o-Nitrophenyldihydropyridinderivates.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 373-377

91) SEYDEL, J.-K., SCHAPER, K.J., WEMPE, E., CORDES, H.P. (1976)
Mode of action and quantitative structure-activity correlations of tuberculostatic drugs of the isonicotinic acid hydrazide type.
J. Med. Chem. 19, 483-492

92) SMYTH, C.P. (1955)
In: Dielectric Behaviour and Structure.
McGrawhill Verlag New York; 235, 314

93) STRAUER, B.E. (1974)
Inotropic effects of nifedipine: A new coronary dilating agent.
Int. J. Clin. Pharmacol. 92, 101-107

94) STRAUER, B.E. (1975)
In: Dynamik, Koronardurchblutung und Sauerstoffverbrauch des normalen und kranken Herzens.
S. Karger Verlag, Basel-München-Paris-London-New York-Sydney, 16-18

95) SWAIN, C.G., LUPTON, E.C.jr. (1968)
Field and resonance components of substituent effects.
J. Am. Chem. Soc. 90, 4328-4337

96) TAFT, R.W.jr. (1956)
Separation of polar, steric and resonance effects.
In: Steric Effects in Organic Chemistry (ed.: M.S. Newman), Wiley & Sons, New York, 586

97) TAIRA, N., NARIMATSU, A. (1975)
Effects of nifedipine, a potent calcium-antagonistic coronary vasodilator, on atrioventricular conduction and blood flow in the isolated atrioventricular node preparation of the dog.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 209, 107-112

98) TOPLISS, J., COSTELLO, R.J. (1972)
Chance correlations in structure-activity studies using multiple regression analysis.
J. Med. Chem. 15, 1066-1068

99) TRITTHART, H., FLECKENSTEIN, A., KAUFMANN, R., BAYER, R. (1968)
Die spezifische Beschleunigung des Erschlaffungsprozesses durch sympathische Überträgerstoffe und die Hemmung dieses Effektes durch ß-Rezeptoren-Blockade. Versuche an isolierten Papillarmuskeln von Rhesus-Affen und Meerschweinchen sowie an Ventrikelstreifen vom Frosch.
Pflügers Arch. Ges. Physiol. 303, 350-365

100) TUTE, M. (1971)
Principles and practice of Hansch-analysis: A guide to structure-activity correlation for the medicinal chemist.
Adv. Drug Res. 6, 1-77

101) VATER, W., KRONEBERG, G., HOFFMEISTER, F., KALLER, H., MENG, K., OBERDORF, A., PULS, W., SCHLOSSMANN, K., STOEPEL, K. (1972)
Zur Pharmakologie von 4-(2'-Nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester (Nifedipine), BAY a 1040.
Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 22, 1-14

102) WEBER, A. (1971a)
Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum. I. The effect of accumulated calcium on transport and adenosinetriphosphate hydrolysis.
J. Gen. Physiol. 57, 50-63

103) WEBER, A. (1971b)
Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum. II. Inhibition of outflux in calcium-free media.
J. Gen. Physiol. 57, 64-78

104) WINEGRAD, S. (1965)
Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 48, 455-479

105) WINEGRAD, S. (1968)
Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus.
J. Gen. Physiol. 51, 65-83

106) WINEGARD, S. (1970)
The intracellular site of calcium activation of contraction in frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 55, 77-88

107) WINEGRAD, S., SHANES, A.M. (1962)
Calcium flux and contractility in guinea pig atria.
J. Gen. Physiol. 45, 371-394

108) WOHL, A.J., HAUSLER, L.M., ROTH, F.R. (1967)
Studies on the mechanism of antihypertensive action of diazoxide: in vitro vascular pharmacodynamics.
J. Pharm. Exp. Ther. 158, 531-539

109) WUSSLING, M., SZYMANSKI, G. (1973)
Ein Zwei-Ca-Speicher-Modell zur qualitativen Beschreibung von Potentiationserscheinungen am Kaninchenpapillarmuskel.
Nova Acta Leopoldina 38, 141-173

110) ZAHRADNIK, R., CHVAPIL, M. (1960)
Study on the relationship between the magnitude of biological activity and the structure of aliphatic compounds.
Experientia 16, 511-512

7. ANHANG

Nifedipine (BAN) Nifedipin (INN) Adalat (R) 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitro-phenyl)-pyridin-3,5-dicarbonsäuredimethylester
Verapamil (INN, BAN) Isoptin (R) 5-[N-(3,4-Dimethoxy-phenaethyl)-N-methyl-amino]-2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-isopropyl-valeronitril
D 600 (Firmenbezeichnung) 5-[N-(3,4-Dimethoxy-phenaethyl)-N-methyl-amino]-2-3,4,5-trimethoxy-phenyl)-2-isopropyl-valeronitril
Fendiline (INN) Sensit (R) N-(1-Phenyl-aethyl)-3,3-diphenylpropylamin
Prenylamin (INN) Segontin (R) N-(1-Methyl-phenaethyl)-3,3-diphenylpropylamin
Diltiazem (INN) Herbesser (R) 3-Acetoxy-2,3-dihydro-5-[2-(dimethylamino)aethyl]-2-(p-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5H)-on
Diazoxide (INN) Hypertonalum (R) 7-Chlor-3-methyl-2H-1,2,4,benzothiadiazin-1,1-dioxid
Cinnarizin (INN) Stutgeron (R) N-Benzhydryl-N'-transcinnamyl-diaethylendiamin
Bencyclan (INN) Fludilat (R) N-[3-(1-Benzyl-cycloheptyl-oxy-propyl]-N,N-dimethyl-amin

Tabelle 23: Nomenklatur von "Ca-antagonistischen" Substanzen. INN = Internationale Kurzbezeichnung, BAN = British Approved Name, R = eingetragenes Warenzeichen.

Herrn Prof. Dr. R. Kaufmann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für anregende Diskussionen und wertvolle Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. L. Birkofer danke ich für die fachliche Unterstützung sowie die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. R. Steiner und Herrn Dr. Möller gilt mein Dank für die mathematische Ausarbeitung der quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse sowie Herrn Dr. R. Bayer und allen Mitarbeitern des Lehrstuhl für Klinische Physiologie für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Den Herren Dr. Bossert und Dr. Meyer, die Nifedipine und seine Derivate synthetisierten, sei an dieser Stelle ebenso mein Dank ausgesprochen wie der Firma Bayer AG., die alle Testsubstanzen freundlicherweise zur Verfügung stellte.

L E B E N S L A U F

Name:	Ralph Rodenkirchen
Geburtstag:	10.10.1947
Geburtsort:	Bergisch-Gladbach
Eltern:	Günter Rodenkirchen, Kaufmann und Maria Rodenkirchen, geb. Roth
Heirat:	31.8.1973 Inge Rodenkirchen, geb. Dziersan

Ausbildungsgang:

1954 - 1956	Volksschule, Köln-Dellbrück
1956 - 1959	Volksschule, Frechen
1959 - 1967	Albertus Magnus Gymnasium, Köln, Mathematisch-Naturwissenschaftlicher Zweig
Juli 1967	Reifeprüfung
1967 - 1969	Apothekerpraktikant, Köln
Sept. 1969	Pharmazeutische Vorprüfung, Köln
1970 - 1973	Pharmaziestudium, Frankfurt/M.
Juli 1973	Staatsexamen
August 1973	Approbation als Apotheker
1973 - 1974	Apothekertätigkeit, Düsseldorf
Oktober 1974	Beginn der Arbeiten für die vorliegende Dissertation am Lehrstuhl für Klinische Physiologie der Universität Düsseldorf

Fotodruck Mainz, 5100 Aachen, Neupforte 13, Nähe Markt, Telefon (02 41) 2 73 05